OTTO HEINRICH WARBURG

Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden

Angewandt auf Krebs, Photosynthese und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen

New Methods of Cell Physiology

Applied to Cancer, Photosynthesis, and Mechanism of X-Ray Action

GEORG THIEME VERLAG · STUTTGART

INTERSCIENCE PUBLISHERS · NEW YORK
A DIVISION OF JOHN WILEY & SONS

MBL/WHOI
0 0301 0013175 1

Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden

Angewandt auf Krebs, Photosynthese
und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen

New Methods of Cell Physiology

Applied to Cancer, Photosynthesis,
and Mechanism of X-Ray Action

New Methods of Cell Physiology

Applied to Cancer, Photosynthesis, and Mechanism of X-Ray Action

Developed 1945 - 1961

by OTTO HEINRICH WARBURG
ORDER POUR LE MÉRITE
Director, Max-Planck-Institute for Cell Physiology
Berlin-Dahlem

With 177 Figures

1962 INTERSCIENCE PUBLISHERS · NEW YORK
A DIVISION OF JOHN WILEY & SONS

Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden

Angewandt auf Krebs, Photosynthese und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY
WOODS HOLE
LIBRARY
MASS.

Arbeiten aus den Jahren 1945-1961

von OTTO HEINRICH WARBURG

Direktor des Max-Planck-Instituts für Zellphysiologie
Berlin-Dahlem

Mit 177 Abbildungen

1962 GEORG THIEME VERLAG · STUTTGART

Von demselben Autor / From the same author:

Stoffwechsel der Tumoren.
Springer, Berlin 1926 (vergriffen).

Katalytische Wirkungen der lebendigen Substanz
Springer, Berlin 1928 (vergriffen).

The Metabolism of Tumors
Constable and Co., Ltd., London 1930

Translated by Frank Dickens

Schwermetalle als Wirkungsgruppe von Fermenten
Werner Saenger, Berlin 1948 (vergriffen).

Wasserstoffübertragende Fermente
Werner Saenger, Berlin 1948 (vergriffen).

Heavy Metals and Enzyme Action
Clarendon Press, Oxford 1949

Translated by Alexander Lawson

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung
sowie der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten.

Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form
(durch Photokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren)
ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden.

The special contents of this edition Copyright ©
by Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962. Printed in Germany.
Satz und Druck: Union Druckerei GmbH Stuttgart

EMIL FISCHER (1852—1919)

dessen Arbeiten über die Kohlehydrate, die Purine und die Peptide
das Fundament der Biochemie von heute sind,
der 1910 den Anstoß zur Gründung der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft gab.
Denkmal in Talar mit Orden Pour le mérite im Garten des
Max-Planck-Instituts für Zellphysiologie in Berlin-Dahlem

Vorwort

Es sind zwei Probleme gewesen, die uns zur Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden veranlaßt haben, ein medizinisches Problem, die Entstehung der Krebszellen; und ein allgemein-biologisches Problem, die Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie in den grünen Zellen. Die vorliegende Sammlung enthält methodisch wichtige Arbeiten, die wir in den Jahren 1945 bis 1960 veröffentlicht haben, sowie 20 Beiträge von 1961, die an anderer Stelle nicht veröffentlicht worden sind.

Ich glaube, daß jeder, der auf den genannten Gebieten weiterarbeiten will, die neuen Methoden kennen muß und imstande sein muß, sie anzuwenden.

Preface

There have been two problems which caused us to develop further our cell-physiological methods: a medical problem, the origin of cancer cells; and a general biological problem, the conversion of light energy into chemical energy in green cells. The present collection contains methodologically important papers, which we published in the years 1945 to 1961, as well as 20 papers written in 1961 that have not been published elsewhere.

I believe that anyone intending to work in the two fields must be familiar with these methods and must be capable to apply them.

Berlin-Dahlem, November 1961

OTTO WARBURG

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY
WOODS HOLE
LIBRARY
MASS.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort VII

Preface VII

Einleitung 1

Introduction 21

1 D. Burk
Biographical Sketch 43

2 O. Warburg
Über die Kristallisation von Gärungsfermenten und ihre optischen Teste 47

3 O. Warburg
Über den Quantenbedarf der Kohlensäureassimilation 73

4 O. Warburg, V. Schocken
A Manometric Actinometer for the Visible Spectrum 75

5 D. Burk, St. Hendricks, M. Korzenovsky, V. Schocken, O. Warburg
The Quantum Efficiency of Photosynthesis 80

6 O. Warburg, D. Burk, V. Schocken
The Maximum Efficiency of Photosynthesis 92

7 O. Warburg, D. Burk, V. Schocken, M. Korzenovsky, St. B. Hendricks
Does Light Inhibit the Respiration of Green Cells? 100

8 O. Warburg, D. Burk,
The Maximum Efficiency of Photosynthesis 103

9 O. Warburg, D. Burk, A. L. Schade,
Extensions of Photosynthetic Experimentation 129

10 D. Burk, O. Warburg,
1-Quanten-Mechanismus und Energie-Kreisprozeß bei der Photosynthese 135

11 D. Burk, O. Warburg,
1-Quanten-Reaktion und Kreisprozeß der Energie bei der Photosynthese 137

12 O. Warburg,
1-Quanten-Mechanismus der Photosynthese 154

12a O. Warburg, H. Geleick, K. Briese,
Weitere Steigerung des Energiegewinnes im Kreisprozeß
der Photosynthese 165

13 O. Warburg, H.-S. Gewitz,
Cytohämin aus Herzmuskel 175

14 O. Warburg, H.-S. Gewitz,
Cyto-Deutero-Porphyrin 178

79806

15 O. Warburg, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Über Gewinnung und Abbau des Cytohämins 182

16 H.-S. Gewitz, W. Völker,
Über die Synthese einiger Deuteroporphyrine 189

17 O. Warburg, E. Hiepler,
Versuche mit Ascites-Tumorzellen 197

18 O. Warburg, G. Krippahl, W. Buchholz, W. Schröder,
Weiterentwicklung der Methoden zur Messung der Photosynthese 201

19 O. Warburg,
Über die Wirkungsgruppen der oxydierenden und reduzierenden Fermente 208

20 O. Warburg,
Über das Verhalten von Aszites-Tumorzellen zu Sauerstoff von höheren Drucken 216

21 O. Warburg, K. Gawehn,
Isolierung der Hefezymohexase und ihre Kristallisation als Quecksilbersalz 220

22 O. Warburg, K. Gawehn, G. Lange,
Über das Verhalten von Ascites-Krebszellen zu Zymohexase 224

23 O. Warburg, H. Klotzsch, K. Gawehn,
Über die Oxydationsreaktion der Gärung 231

24 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Stöchiometrische Versuche mit dem oxydierenden Gärungsferment 234

25 O. Warburg, G. Krippahl,
Messung der Lichtabsorption in Chlorella mit der Ulbrichtschen Kugel 237

26 O. Warburg,
Über die Berücksichtigung der Retention der Kohlensäure bei Messungen der Photosynthese in Kulturlösungen 239

27 O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder, W. Buchholz, E. Theel,
Über die Wirkung sehr schwachen blaugrünen Lichts auf den Quantenbedarf der Photosynthese 242

27a O. Warburg,
Krebsforschung 244

28 O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder,
Katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts auf den Energieumsatz bei der Photosynthese 248

29 O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder,
Wirkungsspektrum eines Photosynthese-Ferments 261

30 O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder, W. Buchholz,
Sauerstoff-Kapazität der Chlorella 274

31 O. Warburg, W. Schröder,
Versuche über die Sauerstoff-Kapazität der Chlorella 289

31a O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder,
Über den chemischen Mechanismus der Kohlensäureassimilation 294

31b O. Warburg, G. Krippahl,
Über die CO_2-Kapazität der Chlorella und den chemischen Mechanismus der CO_2-Assimilation 305

31c O. Warburg, G. Krippahl,
Über die funktionelle Carboxylgruppe des Chlorophylls 310

32 O. Warburg, G. Krippahl, W. Buchholz,
Wirkung von Vanadium auf die Photosynthese 312

33 O. Warburg, G. Krippahl,
Photochemische Wasserzersetzung durch lebende Chlorella 313

34 O. Warburg,
Über die Messung des Energieumsatzes bei der Photosynthese mit dem Großflächen-Bolometer 320

35 O. Warburg,
On the Origin of Cancer Cells 322

36 S. Weinhouse,
Discussion: On Respiratory Impairment in Cancer Cells 335

36a D. Burk, A. L. Schade,
Discussion: On Respiratory Impairment in Cancer Cells 339

36b O. Warburg,
Discussion: On Respiratory Impairment in Cancer Cells 344

37 O. Warburg, G. Krippahl,
Über die funktionelle Kohlensäure der Chlorella 347

38 O. Warburg, W. Schröder, H.-W. Gattung,
Züchtung der Chlorella mit fluktuierender Lichtintensität 361

39 O. Warburg, G. Krippahl,
Ausbau der manometrischen Methoden 366

40 O. Warburg, G. Krippahl,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden 369

41 O. Warburg, G. Krippahl,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden 374

42 O. Warburg, G. Krippahl,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Carbonatgemische) 378

42a O. Warburg, H. Klotzsch, G. Krippahl,
Glutaminsäure-Decarboxylase in Chlorella 383

43 O. Warburg, H. Klotzsch, G. Krippahl,
Über das Verhalten einiger Aminosäuren in Chlorella bei Zusatz von markierter Kohlensäure 384

44 O. Warburg,
Photosynthesis 386

45 O. Warburg, H. Klotzsch, G. Krippahl,
Glutaminsäure in Chlorella 400

46 O. Warburg, G. Krippahl,
Beweis der Notwendigkeit der Glutaminsäure für die Photosynthese ... 411

47 O. Warburg, W. Schröder,
Quantenbedarf der Photosynthese 414

48 O. Warburg, H.-S. Gewitz, W. Völker,
D-(—)-Milchsäure in Chlorella 423

49 O. Warburg, G. Krippahl,
Sauerstoff-Halbwertdrucke der Photosynthese und Atmung 427

50 O. Warburg, G. Krippahl, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Carotinoid-Oxygenase in Chlorella 431

51 O. Warburg, G. Krippahl,
Hill-Reaktionen 435

52 O. Warburg, D. Kayser,
Wirkung von Kohlenoxyd auf Atmung und Photosynthese in grünen Keimblättern 443

53 O. Warburg, G. Krippahl,
Neubestimmung des Quantenbedarfs der Photosynthese mit der Kompensationsmethode 447

54 O. Warburg, G. Krippahl,
Glykolsäurebildung in Chlorella 458

55 O. Warburg, G. Krippahl, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Über den chemischen Mechanismus der Photosynthese 462

56 O. Warburg, G. Krippahl,
Notwendigkeit der Kohlensäure für die Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen in grünen Grana 481

57 O. Warburg, G. Krippahl, H.-W. Gattung,
1-Gefäß-Methode zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese 484

58 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Stoffwechsel von embryonalen Zellen und von Krebszellen 488

59 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen 496

60 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Über die Wirkung von Wasserstoffperoxyd auf Krebszellen und auf embryonale Zellen 501

61 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Über die Entstehung des Krebsstoffwechsels in der Gewebekultur 505

62 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Stoffwechsel der weißen Blutkörperchen 509

63 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Katalasegehalt, Gärung und Atmung in der Zellkultur nach Dulbecco-Vogt 511

64 O. Warburg, W. Schröder, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Manometrisches Röntgenstrahlen-Aktinometer und über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Gärung von Krebszellen 515

65 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler, W. Schröder, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Partielle Anaerobiose und Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen 524

66 O. Warburg, W. Schröder, H.-W. Gattung,
Über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Hämoglobin (Mit einer Bemerkung über die Strahlenempfindlichkeit von Gewebeschnitten) 534

67 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel 539

68 O. Warburg, G. Krippahl,
Manometrische Bestimmung der Ascorbinsäure 541

69 O. Warburg, A. Lehmann, H.-W. Gattung,
Über den Quantenbedarf der Photosynthese in Blättern 542

70 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler,
Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden (Verbindung von Manometrie und optischer Milchsäurebestimmung) 545

71 O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler, S. Lorenz
Über die Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel 548

72 H.-S. Gewitz, W. Völker,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Herstellung definierter Blausäure-Konzentrationen) 553

73 O. Warburg, G. Krippahl,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Universalgefäße) .. 555

74 T. Terranova, K. Gawehn,
Stoffwechsel der Zellen des trypsinisierten Knochenmarks 557

75 O. Warburg, G. Krippahl,
Ortho- und meta-Phenanthrolin in Chlorella 560

76 O. Warburg, K. Gawehn, T. Terranova,
Weitere Versuche über die Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel 562

77 O. Warburg, G. Krippahl,
Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Wechsel aerober und anaerober Bedingungen) 564

78 O. Warburg, G. Krippahl,
Über den Photolyten der Photosynthese 567

79 O. Warburg, A.-W. Geissler, S. Lorenz,
Neue Methoden zur Bestimmung des CO_2-Drucks über Bicarbonat-Carbonatgemischen 578

80 O. Warburg, A.-W. Geissler, S. Lorenz,
Quantenausbeute der Photosynthese als Funktion des CO_2-Drucks 582

81 H.-S. Gewitz, W. Völker,
3-Hydroxytyramin, ein biologischer Oxydationskatalysator der Photosynthese 583

82 O. Warburg, A.-W. Geissler, S. Lorenz,
Weitere Versuche über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel der Krebszellen 585

83 O. Warburg, D. Kayser,
Über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel von Milchsäurebakterien 588

84 O. Warburg, G. Krippahl, H.-S. Gewitz, W. Völker,
Über die Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll 595

85 O. Warburg, G. Krippahl,
Wasserstoffperoxyd in Chlorella 606

86 O. Warburg, G. Krippahl, K. Jetschmann,
Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure in Chlorella 609

87 O. Warburg, K. Jetschmann,
Hemmung der Phosphorylierung durch Phenanthrolin in lebender Chlorella 612

88 O. Warburg, K. Jetschmann,
Wirkung der Blausäure auf die Bildung des Photolyten der Photosynthese 615

89 O. Warburg, K. Gawehn,
Über die Messung der Atmung von Krebszellen mit einer 1-Gefäß-Methode 618

90 O. Warburg und D. Kayser,
Über Wachstumshemmung durch Röntgenstrahlen 620

91 O. Warburg,
Über Phosphorylierung im Licht 622

92 O. Warburg,
Beweis, daß der Photolyt der Photosynthese eine Kohlensäureverbindung ist 625

93 O. Warburg,
Über die fakultative Anaerobiose der Krebszellen und ihre Anwendung auf die Chemotherapie 627

94 O. Warburg,
Über die Klassifizierung der Krebszellen auf der Basis der Anaerobiose in vivo 631

95 O. Warburg,
Über Phosphorylierung durch Dehydrierung 633

Sachverzeichnis 635

Subject-Index 641

Einleitung*

Motto: «De fixer les objets longtemps sans être fatigué.»

Allgemeines über unsere Methoden und ihre Anwendungen

Als Mitarbeiter Emil Fischers habe ich in den Jahren 1903 bis 1906 die ersten optisch aktiven Peptide dargestellt und dabei, zum engeren Kreis seiner Mitarbeiter gehörend, die Methoden und Arbeitsweise des größten Organikers unserer Zeit kennengelernt. Später habe ich im Strahlungslaboratorium der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt, deren Präsident mein Vater von 1906 bis 1922 gewesen ist, die Arbeiten über den Quantenbedarf der Photosynthese begonnen. Es war das Laboratorium, aus dessen Versuchen Max Planck im Jahr 1900 sein Strahlungsgesetz ableitete und das Wirkungsquantum $h = 6{,}55 \cdot 10^{-27}$ erg · sek berechnete. Es war das Laboratorium, in dem Emil Warburg die ersten Quantenausbeuten photochemischer Reaktionen gemessen hat.

So kam es, daß in dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie die Methoden weit getrennter Gebiete, der Strahlungsphysik und der organischen Chemie, in einer Hand vereinigt wurden. Das Ergebnis war der chemische Mechanismus der Fermentwirkungen, die Zurückführung der Fermentwirkungen auf sehr schnelle Zwischenreaktionen an Proteine gebundener Wirkungsgruppen, die wir von den Fermenten getrennt und kristallisiert haben. Kofermente aber und viele Vitamine erwiesen sich als nichts anderes als freie Wirkungsgruppen von Fermenten.

Ich möchte das für unser Institut charakteristische Zusammenwirken physikalischer und chemischer Methoden an einigen Beispielen erläutern.

Mit den Methoden der Strahlungsphysik wurde die Substanz entdeckt, mit der der molekulare Sauerstoff in der lebenden Welt reagiert. Mit den Methoden der organischen Chemie wurde diese Substanz, die eine Eisenverbindung ist, von den Zellen getrennt und kristallisiert. — Mit den Methoden der Strahlungsphysik wurden die Wirkungsgruppen der wasserstoffübertragenden Fermente entdeckt, mit den Methoden der organischen Chemie wurden diese Wirkungsgruppen von den Zellen getrennt und kristallisiert. Aus dem Zusammenwirken der sauerstoff- und wasserstoffübertragenden Fermente ergab sich dann die Kette der Atmungsfermente — die allgemeine Lösung des Problems der Lavoisierschen Atmung. — Mit den Methoden der Strahlungsphysik wurde die Hauptreaktion der Gärungen als Wasserstoffübertragung durch Nikotinsäureamid erkannt, mit den Methoden der organischen Chemie wurde aus gärenden Zellen die 1,3-Diphosphoglycerinsäure isoliert, deren Bildung und Zerfall bei den Gärungen die Verwandlung der Gärungsenergie in Phosphatenergie chemisch erklärt. — Mit physikalischen Methoden wurde die Gärung der Krebszellen entdeckt und damit das ungeordnete

---

* Die kursiv gedruckten Zahlen dieser Einleitung sind die Nummern der Arbeiten in dem vorstehenden Inhaltsverzeichnis.

* Andere Literaturstellen sind in dieser Einleitung nur angeführt, wenn ältere eigene Arbeiten oder Arbeiten anderer Autoren zitiert werden.

Wachstum der Krebszellen durch eine Form der Energiegewinnung erklärt, die zu der Zeit herrschte, als die Erdatmosphäre noch keinen Sauerstoff enthielt — ein Ergebnis, das die letzte Ursache des Krebses in der anaeroben Vergangenheit des Lebens sieht. — Mit den Methoden der Strahlungsphysik wurde der Quantenbedarf der Photosynthese gemessen und gefunden, daß etwas weniger als 3 Lichtquanten zur Spaltung von 1 CO_2 in $C + O_2$ notwendig sind, was im Rot eine fast vollständige Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie bedeutet. Hierbei spaltet 1 Lichtquantum aus einer durch die Atmung veränderten Kohlensäure primär 1 Molekül Sauerstoff ab, von dem aber $^2/_3$ wieder zurückreagieren, so daß in der Bilanz 3 Lichtquanten 1 Molekül CO_2 spalten. Ein Mehrquanten-Problem der Photosynthese existiert hiernach nicht mehr. Die Photosynthese ist eingeordnet in die gewöhnlichen photochemischen Reaktionen der unbelebten Welt. Auf dieser Basis wird heute die spezielle Chemie der Photosynthese mit den Methoden der Manometrie und der organischen Chemie untersucht, wobei unsere Ergebnisse der allgemeinen Energetik in ausgezeichneter Weise bestätigt worden sind.

Die besten physikalischen und chemischen Methoden aber wären nicht imstande gewesen, die Zellphysiologie zu fördern, wenn sie nicht verbunden worden wären mit einer Vereinfachung der physiologischen Versuchsanordnungen. Anstelle der Durchblutung überlebender Organe wurde die Methode der dünnen Gewebsschnitte, anstelle der Gewebe wurden die einzelligen Versuchsobjekte eingeführt. Rote Blutzellen, die kernlosen der Säugetiere und die kernhaltigen der Vögel, waren die ersten Objekte bei der Untersuchung des chemischen Mechanismus der Zellatmung. Anstelle der grünen Blätter wurden — zur Untersuchung der Photosynthese — die einzelligen Grünalgen eingeführt; oder die grünen Grana der Spinat-Chloroblasten oder die durch Beschallung gewonnenen noch viel kleineren grünen Grana der Chlorella. Anstelle der Tumoren wurden — zur Untersuchung der Krebszellen — die Ascites-Krebszellen eingeführt, anstelle der ganzen tierischen Zellen — bereits 1914 — die Grana der Leberzellen[1]. Immer war dabei unser Bestreben die Vereinfachung der Versuche und eine mit den Methoden der Maßanalyse vergleichbare Schnelligkeit und Genauigkeit der Versuche. Mit keiner komplizierten Versuchsanordnung haben wir jemals irgend etwas wesentliches entdeckt.

SPEZIELLER TEIL

I. Optische Messung der Hydrierung und Dehydrierung

Wer die Biochemie vor der Entdeckung der wasserstoffübertragenden Funktion des Nikotinsäureamids nicht erlebt hat, kann die Bedeutung einer Methode nicht ermessen, die auf der Lichtabsorption der Dihydro-Pyridinnukleotide im nahen U. V. bei 340 mμ beruht und von der es nicht übertrieben ist zu sagen, daß sie den Zeitaufwand, der zum Nachweis und zur Messung der wichtigsten Stoffwechselreaktionen notwendig ist, im Durchschnitt auf den 100. Teil verkürzt hat. Die Methode ist nicht auf Hydrierungen und Dehydrierungen beschränkt, sondern kann auch auf Spaltungen, Phosphorylierungen und alle Vorgänge ausgedehnt werden, die irgendwie mit Hydrierungen oder Dehydrierungen gekoppelt werden können. Die Arbeit *(2)* dieser Sammlung erläutert dies am Beispiel der Gärungsreaktionen.

Ist c die Konzentration des Dihydronikotinsäureamids, d der Lichtweg der Wellenlänge 340 mμ und β die Absorptionskonstante des Dihydronikotinsäureamids, so ist der natürliche Logarithmus der Lichtschwächung

$$ln \frac{i_0}{i} = \beta \times c \times d$$

Drücken wir c in Mikromolen pro ccm und d in cm aus, so erhält β die Dimension cm²/Mikromole. Der Zahlenwert von β

$$\beta = 14 \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\,\text{Mole}}\right]$$

gehört zu den wichtigsten Größen der Biochemie. Kennt man ihn, so kann man sofort hinschreiben, wieviel Mikromole Wasserstoff pro ccm in irgendeiner Flüssigkeit übertragen worden sind, wenn man $\frac{i_0}{i}$ gemessen hat

$$\Delta c = \frac{\Delta\, ln \frac{i_0}{i}}{\beta \times \text{d}} \left[\frac{\mu\,\text{Mole}}{\text{cm}^3}\right]$$

Ist zum Beispiel $\frac{i_0}{i} = 2$ und $d = 1$ cm, so wird

$$\Delta c = \frac{\Delta\, ln \frac{i_0}{i}}{\beta \times d} = \frac{0{,}7}{14} = 0{,}05 \left[\frac{\mu\,\text{Mole}}{\text{cm}^3}\right]$$

woraus man sieht, daß die optische Methode sehr empfindlich ist, rund 10mal so empfindlich wie unsere biologische Manometrie.

An den Vorschriften zur Ausführung der Methode hat sich seit 1935[2], seit der Entdeckung der Funktion und der U.V.-Bande des Dihydro-Nikotinsäureamids, nichts geändert. Doch ist die Methode erst allen zugänglich geworden, seit unsere Photozelle durch die Spektralphotometer von BECKMAN und Zeiss-Oberkochen

ersetzt worden ist und seit die Firma Böhringer die reinen Stoffwechselfermente in den Handel bringt.

Nikotinsäureamid kann im menschlichen Körper nicht in ausreichendem Maß synthetisiert werden und ist deshalb für den Menschen ein unentbehrliches Vitamin. Es ist weniger bekannt, daß Nikotinsäureamid auch ein wirksames Chemotherapeutikum ist. 10 Jahre nach der Entdeckung der physiologischen Funktion des Nikotinsäureamids, im Jahr 1945, fand VITAL CHORINE[3], daß man mit Nikotinsäureamid tuberkulöse Meerschweichen und leprakranke Ratten heilen kann, wobei 0,3 bis 1 g pro Kilo Tier zur Heilung genügten. *Die freie Nikotinsäure war therapeutisch unwirksam.* Diese Wirkung des Nikotinsäureamids, einer völlig ungiftigen, als Bestandteil der wasserstoffübertragenden Fermente physiologisch notwendigen Substanz war für GERHARD DOMAGK der Anlaß, Nikotinsäureamid und seine Isomeren und Homologen bei der menschlichen Tuberkulose zu prüfen. Das Ergebnis war das Isonikotinsäure-Hydrazid, das heute das wirksamste Heilmittel gegen menschliche Tuberkulose ist.

II. Manometrie

Die komplizierte manometrische Apparatur, z. B. zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese — Differentialmanometer, Ablesung mit dem Kathetometer-Mikroskop, Kreisbewegung runder Gefäße — ist 1945 ersetzt worden durch einfache Manometer, Ablesung mit dem unbewaffneten Auge und gradlinige Bewegung von Kastengefäßen (*8*). Durch den Übergang von der Kreisbewegung zur gradlinigen Bewegung der Manometriegefäße ist eine Hauptfehlerquelle der Manometrie fortgefallen, die Bildung von Schaumblasen beim Schütteln der Gefäße. Eine Zellsuspension, die früher bereits nach einstündigem Schütteln voller Schaumblasen war, ist heute nach 24stündigem Schütteln frei von Schaumblasen, so daß wir zu beliebig langen Versuchszeiten übergehen und beliebig große manometrische Ausschläge erhalten konnten — ein Beispiel dafür, was man mit scheinbar geringen methodischen Änderungen erreichen kann. Wenn bei gradliniger Bewegung bestrahlter Manometriegefäße die Gefahr besteht, daß sich die Manometriegefäße an den Enden ihrer Bahn aus dem Lichtstrahl hinausbewegen, so kann man dies durch mitbewegte Spiegel, die an den Manometern angebracht werden, verhindern.

Einfacher geworden sind auch die Stoffwechselmessungen in Serum, weil die komplizierte Berechnung der Retention der Kohlensäure durch eine einfache Bestimmungsmethode zur Bestimmung der Retention ersetzt worden ist.

Einen entscheidenden Fortschritt der Manometrie (*41*, *42*, 73) bedeutet die Einführung der neuen „Anhänger"- und „Wannengefäße", die die alten Manometriegefäße vollständig verdrängen werden. Alle neuen Manometergefäße werden in Deutschland hergestellt von Helmut Hanff, Seesen im Harz; oder von Braun-Melsungen; im übrigen von Aminco, Silver Springs, Maryland, USA. In den *Anhängergefäßen* halten Carbonat-Bicarbonat-Gemische, die in die Anhänger gegeben werden, den Kohlensäuredruck konstant und zwar in einem Gebiet von 0,3 bis 600 mm Brodie, während sich die Zellen im Hauptraum in ihren physiologi-

schen Medien befinden und also nicht durch die Carbonatgemische, in denen sie früher suspendiert wurden, geschädigt werden können. Die Methode bedeutet die Lösung des ältesten Problems der biologischen Manometrie: mit Hilfe *eines* Gefäßes den Sauerstoffwechsel bei physiologischen Kohlensäuredrucken zu bestimmen. Sie macht die 2-Gefäß-Methode überall da überflüssig, wo die Kohlensäure nicht interessiert. Die Methode ist bereits benutzt worden, um mit *einem* belichteten Gefäß den Quantenbedarf der Photosynthese zu bestimmen; oder um den Sauerstoffverbrauch von Krebszellen zu bestimmen, deren Atmung mit der 2-Gefäß-Methode wegen der großen aeroben Gärung nur ungenau bestimmt werden kann.

Die neuen *Wannengefäße* sind Kegel, deren Einsätze nicht am Boden des Hauptraums, sondern im oberen Drittel des Hauptraums befestigt sind. Die Einsätze haben nicht mehr die Form von Zylindern, sondern die Form von flachen Wannen und sind mit einer Birne verbunden, aus der man Substanzen in die Wanne geben kann. Eine zweite Birne ist nicht mit der Wanne, sondern mit dem Hauptraum verbunden.

Mischen wir in der Wanne Substanzen, die neutral sind und erst beim Mischen alkalisch werden, so können wir die Kohlensäure im Manometriegefäß bestimmen. Säuern wir vorher die Zellsuspension im Hauptraum durch die zweite Birne an, und machen erst dann den Inhalt der Wanne alkalisch, so können wir die gesamte Kohlensäure im Manometriegefäß bestimmen. Mischen wir in der Wanne Substanzen, die beim Zusammengeben Sauerstoff entwickeln, ohne den Kohlensäuredruck zu ändern — zum Beispiel Katalase und H_2O_2 —, so können wir, ohne die Gefäße zu öffnen, von anaeroben zu aeroben Bedingungen übergehen. Mischen wir in der Wanne Substanzen, die beim Zusammengeben Sauerstoff absorbieren, ohne daß die Reaktion alkalisch wird, so können wir, ohne die Gefäße zu öffnen, von aeroben zu anaeroben Bedingungen übergehen.

Von den bisherigen Anwendungen der Wannengefäße seien erwähnt die Messung der Fixierung der Kohlensäure in grünen Zellen, die mit Hilfe der Wannengefäße ungleich sicherer und genauer möglich ist, als mit Hilfe der üblichen ^{14}C-Methode. Es sei ferner erwähnt die Messung der Aufnahme von Kohlensäure in Chlorella durch Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen und die Messung der Abgabe dieser Kohlensäure beim Übergang zu anaeroben Bedingungen. Es sei ferner erwähnt die Messung der Retention der Kohlensäure und der Milchsäure in *einem* Gefäß.

III. Strahlungsmessung (Bolometer)

Das Bolometer, das wir benutzen, ist in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt von LUMMER und von KURLBAUM entwickelt worden. Es ist ein Instrument, das eine große Vergangenheit hat, da mit ihm LUMMER und PRINGSHEIM[4] die Strahlung des schwarzen Körpers gemessen haben, in Versuchen, aus denen im gleichen Jahr PLANCK[5] seine Strahlungsformel abgeleitet und das Wirkungsquantum h berechnet hat ($h = 6{,}55 \cdot 10^{-27}$ erg sek. gegenüber dem heutigen Wert $h = 6{,}63\ 10^{-27}$ erg sek.). Es ist das gleiche Instrument, mit dem EMIL WARBURG[6] in den Jahren 1911—1930 die Grundlagen der quantitativen Photochemie geschaffen hat.

Das Bolometer hat einen Vorzug, durch den es sich von allen anderen absoluten Strahlungsmessern auszeichnet. Läßt man einen Lichtstrahl auf die Platinstreifen des Bolometers fallen und verschiebt dann den Strahl auf der Fläche des Bolometers, so bleibt der elektrische Ausschlag des Bolometers konstant, während bei Verschiebungen eines Strahls auf der Fläche einer Thermosäule die Galvanometerausschläge sich so stark ändern, daß absolute Strahlungsmessungen unmöglich sind.

Die Eichung des Bolometers haben wir vereinfacht (*11*), indem wir die Hefnerlampe durch die geeichte Kohlefadenlampe des Bureau of Standards in Washington ersetzt haben. Verschließt man bei der Eichung das Bolometer anstatt durch ein Quarzfenster durch eine Lithium-Fluoridscheibe, so hat man keine Korrektionen mehr für die selektive Absorption, sondern nur noch für die Reflektion des Eichlichts anzubringen.

Als Lichtquellen benutzen wir die Quecksilber- und Xenon-Hochdrucklampen der Osram A.G., oder Metallfadenlampen von 500 Watt mit kleiner leuchtender Fläche, wie sie für Kinos verwendet werden. Wir isolieren die Spektralbezirke nur noch selten mit Monochromatoren, sondern meistens mit Farbgläsern und Interferenzscheiben. Wir prüfen jeden Spektralbezirk, ehe wir ihn für Messungen der Photosynthese benutzen mit Hilfe einer Lösung von 1 mg/cm^3 Äthylchlorophyllid in Pyridin, die in einer Schichtdicke von 1 cm kein Licht durchlassen darf.

Zu der Weiterentwicklung der Strahlungsmethoden (*11*) gehört auch die Teilung der Lichtstrahlen mit Prismen oder teildurchlässigen Spiegeln und die bolometrische Justierung der beiden Teile auf gleiche Intensität, wie es für die 2-Gefäß-Methode notwendig ist. Für die Aufnahme des blaugrünen Wirkungsspektrums der Photosynthese ist diese Technik so ausgebaut worden, daß zu zwei roten Strahlen gleicher Intensität zwei blaugrüne Strahlen gleicher Intensität hinzugefügt werden konnten.

IV. **Strahlungsmessung** (Quanten-Aktinometer) (*4*)

Neben dem Bolometer benutzen wir für besondere Zwecke zur absoluten Strahlungsmessung das von uns entwickelte Quantenaktinometer, in dem Chlorophyllid oder Phaeophorbid Sauerstoff auf Thioharnstoff überträgt und in dem der verbrauchte Sauerstoff manometrisch gemessen wird. Liegen die in das Manometriegefäß eingestrahlten Quantenintensitäten unter einer gewissen Schwelle, so wird fast genau 1 Molekül Sauerstoff verbraucht, wenn 1 Lichtquantum absorbiert wird.

Sind geordnete Lichtstrahlen zu messen, so ist das Bolemeter dem Aktinometer vorzuziehen. Ist aber diffuses Licht zu messen, so ist das Aktinometer vorzuziehen. Auch die Summe nicht konstanter Lichtintensitäten kann mit dem Aktinometer gemessen werden, da das Aktinometer die eingestrahlten Lichtintensitäten integriert.

V. Strahlungsmessung (Absorptionsmessung) (*25*)

Von Anfang an war der schwierigste Teil der Strahlungsmessungen bei den Bestimmungen der Ausbeute der Photosynthese die Messung der Lichtabsorption in dem trüben Medium der Zellsuspensionen. Unsere erste Lösung des Problems war, so viele Zellen in die Manometriegefäße einzufüllen, daß das eingestrahlte Licht vollständig absorbiert wurde. Damals störte dabei die große Atmung der vielen Zellen. Heute, nachdem die Atmung vor der Einstrahlung des Meßlichts (mit diffusem blaugrünem Licht) kompensiert wird, ist die große Atmung kein Einwand mehr gegen die Methode der vollständigen Absorption.

Unvollständige Absorptionen haben wir zunächst mit dem Quantenaktinometer gemessen, mit dem wir das Manometriegefäß, in dem sich die Zellen befanden, umgaben. Später entwickelten wir zur Messung unvollständiger Absorptionen eine Ulbricht'sche Kugel, in deren Mittelpunkt die Manometriegefäße wie bei den Ausbeutebestimmungen bewegt und belichtet wurden. Gab der in die Oberfläche der Kugel eingebaute Elektronen-Multiplyer für weiße Zellen den Ausschlag i_0 und für grüne Zellen den Ausschlag i, so war der von den grünen Zellen absorbierte Bruchteil des eingestrahlten Lichts

$$a = \frac{i}{i_0}$$

So haben wir nunmehr die Möglichkeit, sehr kleine und sehr große Lichtabsorptionen zu messen, also die Ausbeuten bei der Photosynthese für sehr dünne und sehr dichte Zellsuspensionen zu bestimmen. Daß wir bei 5% Lichtabsorption und bei 100% Lichtabsorption nahezu die gleichen Quantenausbeuten fanden, mag man als eine Kontrolle unserer Methoden der Absorptionsmessung bewerten.

Nach allem, was hier über Strahlungsmessungen gesagt worden ist, benötigen wir zur Messung der absorbierten Lichtenergie im allgemeinen 2 Instrumente. Ein Instrument, das die eingestrahlten Quanten mißt und ein Instrument, das den absorbierten Bruchteil der eingestrahlten Quanten mißt. Also zum Beispiel ein Bolometer und eine Ulbricht'sche Kugel. Wegen mißbräuchlicher Anwendungen des Bolometers durch Calvin und Daniels sei darauf hingewiesen, daß man das Bolometer nicht zur Messung der Absorption des Lichts benutzen kann. (*34*)

VI. Metallo-Fermente (*2*)

Während die Wirkung des Eisens oder des Kupfers in den sauerstoffübertragenden Fermenten durch ihren Valenzwechsel vollständig chemisch erklärt worden ist, gibt es eine zweite Art von Metallofermenten, in denen das Metall nicht durch Valenzwechsel wirkt, z. B. wenn Zink wirksam ist; oder wenn mehrere Metalle sich gegenseitig vertreten können. Ein derartiges Metalloferment ist die Hefezymohexase, die Hexosediphosphat in Triosephosphat spaltet und die zur Aktivierung des Zinks oder des Kobalts oder des Eisens bedarf.

Unsere Methode zum Nachweis funktioneller Schwermetalle in Fermenten, die

wir 1938 eingeführt haben, ist *nicht* die Analyse, die wegen des großen Molekulargewichts der Fermente unsicher ist und die nichts über die Funktion aussagt; sondern die Methode ist die Entfernung der Metalle durch Dialyse gegen Komplexbildner, z. B. gegen Phenanthrolin und die Resynthese der Fermente durch Zusatz von Metallen. Viele funktionelle Schwermetalle sind seit 1938 mit dieser Methode gefunden worden und mehr und mehr scheint es, daß an der Wirkung der meisten Fermente Schwermetalle beteiligt sind. Die lange Polemik gegen das erste funktionelle Schwermetall, das entdeckt wurde — gegen das Eisen der Eisenoxygenase — war offenbar eine Polemik, wie sie nicht unberechtigter sein konnte.

Der chemische Mechanismus der Metallwirkungen in den Metallofermenten zweiter Art ist noch unbekannt. Es gehört zu den rätselhaften Tatsachen der Fermentchemie, daß von den beiden Zymohexasen, die wir kristallisiert haben, die Hefezymohexase ein Metalloferment ist, aber die Muskel-Zymohexase kein Metalloferment ist.

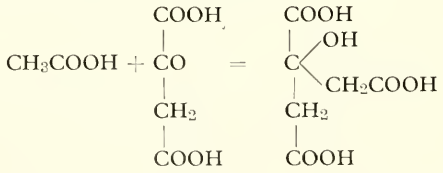
VII. Atmung (*19*)

Seit die Wirkungsgruppen der oxydierenden und reduzierenden Fermente und ihre Ketten entdeckt worden sind[7]

[1] O_2 → Eisenoxygenase → Cytochrom → Flavin → Nikotinsäureamid
[2] O_2 → Kupferoxygenase → Orthochinon → Nikotinsäureamid

hat zur Diskussion gestanden, ob diese Ketten die vollständige Lösung des Problems der biologischen Oxydation und Reduktion sind oder ob sie nur für eine beschränkte Zahl von Substraten gelten. Denn zunächst gelang es nicht, zum Beispiel Fettsäuren oder die so leicht verbrennliche Essigsäure mit Hilfe der Fermentketten in vitro zu oxydieren.

Die Antwort auf diese Frage war das Koferment A, das Lipmann[8] im Jahr 1945 entdeckte und dessen Wirkungsgruppe, wie Lynen[9] im Jahr 1951 fand, die SH-Gruppe ist, die organische Säuren zu Thioestern bindet und sie dadurch gegenüber den Gliedern der Fermentkette reaktionsfähig macht. Flavinproteide dehydrieren an KoA gebundene Fettsäuren[10], Pyridinproteide dehydrieren die dabei entstehende β-Oxysäuren zu Ketonsäuren. Pyridinproteide dehydrieren die an KoA gebundene Brenztraubensäure zu Acetyl-KoA, dessen Essigsäure dann mit Oxalessigsäure zu Zitronensäure zusammentritt



In den Reaktionen des von H. A. Krebs[11] entdeckten Zitronensäurezyklus verbrennt dann das Äquivalent der Essigsäure zu Kohlensäure und Wasser unter Rückbildung von Oxalessigsäure. Die Fermente aber, die diese Oxydationen des Zyklus bewirken — die Oxydation der Isozitronensäure, der Ketoglutarsäure, der Bern-

steinsäure und der Äpfelsäure — sind keine anderen Fermente, als die Pyridinproteide, die Flavinproteide und die Hämoproteide.

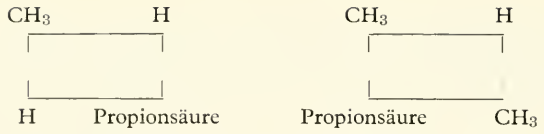
Solche Beispiele ließen sich heute beliebig vermehren. In der Tat, alle biologischen Hydrierungen und Dehydrierungen, die wir kennen, werden durch Glieder unserer Fermentketten bewirkt, die deshalb die allgemeine und vollständige Lösung des Problems der biologischen Oxydation und Reduktion gewesen sind.

Fragen wir uns, warum Substrate durch die Bindung an Koferment A „aktiviert" werden, so möchte ich darauf aufmerksam machen, daß Koferment A das 3fach phosphorylierte Adenosin enthält, das auch im Triphospho-Pyridinnukleotid vorkommt und das hier die Funktion hat, das Nukleotid an die Fermentproteine zu binden; und daß allgemein Phosphat die Gruppe ist, die Substrate und Kofermente an die Fermentproteine bindet, wie z. B. durch einen Vergleich der Reaktionsfähigkeiten von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Glycerinaldehyd oder von phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Lactoflavin gefunden worden ist. Die Idee liegt deshalb nahe, die Bindung an Koferment A als eine Phosphorylierung aufzufassen, die zwar nicht direkt, aber über die Panthoteinbrücke hinweg erfolgt. Dazu stimmt, daß Substrate wie Glukosephosphat oder Triosephosphat, die bereits phosphoryliert sind, der Bindung an Koferment A nicht bedürfen. Andererseits ist es wahr, daß es nichtphosphorylierte Substrate gibt, wie Acetaldehyd und Brenztraubensäure, die ohne Vermittlung von Koferment A an Fermentproteine gebunden und hier von Nikotinsäureamid hydriert werden.

Ein wesentlicher Fortschritt (*13*) (*24*) (*25*) (*26*) auf dem Gebiet der Atmung war die Kristallisation der prosthetischen Gruppe der Eisenoxygenase, des „Cytohämins", womit die Substanz, die in der organischen Welt im wesentlichen den Sauerstoff überträgt, nunmehr auch chemisch isoliert und der chemischen Untersuchung zugänglich geworden war. Cytohämin enthält wie das Bluthämin 2 Propionsäuren, aber anders als das Bluthämin eine Formylgruppe und dafür eine Vinylgruppe weniger. Cytohämin enthält ferner, anders als das Bluthämin, eine Seitenkette vom Molekulargewicht der Größenordnung 200, die gegenüber dem Bluthämin den niedrigeren Eisen- und Stickstoffgehalt bedingt. Ein Vergleich der Elementaranalysen der beiden Chlorferriverbindungen ergab die Prozente:

	C	H	N	Fe	Cl
Cytohämin	64,47	6,79	6,50	6,42	4,20
Bluthämin	62,63	4,94	8,59	8,40	5,43

Cytohämin liefert bei der Resorcinschmelze ein schön kristallisierendes „Deuterohämin", das 3 freie β-Stellen besitzt. S. F. MacDonald[12], ein Schüler Hans Fischers, der die weitere Bearbeitung dieser wichtigen Substanz übernommen hat, fand für die Konstitution des „Cyto-Deuterohämins"



Noch wenig bekannt ist über die Konstitution des Chinons der Fermentkette 2. Zur Diskussion steht, zum mindesten für Pflanzen, die dehydrierte Chlorogensäure, die ein Ester der 3,4-Dioxyzimmtsäure mit Chinasäure ist. MARTIUS[13] hat die Vermutung ausgesprochen, daß Naphtochinon-Proteide allgemein Glieder der Fermentketten sind.

VIII. Gärung (*2*)

Wenn ARTHUR HARDEN[14] recht hat, daß die Oxydo-Reduktion der Gärungen die fundamentale Reaktion der Gärungen ist, weil sich in ihr der Sinn der Gärungen erfüllt, so ist 1939 das Jahr gewesen, in dem der chemische Mechanismus der Gärungen aufgeklärt worden ist. Denn damals[15] wurden im Dahlem die chemischen Reaktionen gefunden, durch die Triosephosphat zu Brenztraubensäure oxydiert und Brenztraubensäure zu Milchsäure reduziert wird:

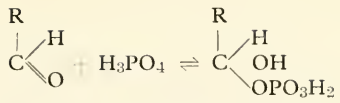
(I) 3-Phosphoglycerinaldehyd + H_3PO_4 ⇌ 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd
(II) 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd + DPN ⇌ 1,3-Diphospho-Glycerinsäure + $DPNH_2$
(III) 3-Phosphoglycerinaldehyd + H_3PO_4 + DPN =
(Bilanz) 1,3-Diphosphoglycerinsäure + $DPNH_2$

1,3-Diphosphoglycerinsäure wird dann durch A.D.P. zu Brenztraubensäure dephosphoryliert und die Brenztraubensäure wird durch das $D.P.N.H_2$, das in Reaktion II entstanden ist, zu Milchsäure hydriert. Alle diese Reaktionen verlaufen in vitro beim Zusammengeben der reinen Substrate und kristallisierten Fermente.

Nur der 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd war damals von uns nicht isoliert worden, da er in wässriger Lösung fast vollständig zu 3-Phosphoglycerinaldehyd und H_3PO_4 hydrolysiert ist. So war in dem ganzen chemischen Mechanismus der Gärungen im Jahr 1939 noch eine einzige Substanz übrig, über die zu streiten eine Möglichkeit bestand.

So entstand jene lange Polemik gegen den 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd, die von MEYERHOF im Jahr 1943 eröffnet wurde und dem LIPMANN und viele nicht minder hervorragende Biochemiker folgten. Weil es um den Schlußstrich unter ein 100jähriges Problem der Biochemie, um den Mechanismus der Gärungen ging, sei der Verlauf dieser Polemik hier beschrieben.

Die zu erklärende Tatsache war, daß der 3-Phosphoglycerinaldehyd nur bei Gegenwart von Phosphat dehydriert wurde und daß nach der Dehydrierung die aufgenommene Phosphorsäure in der 1-Stellung des 3-Phosphoglycerinsäure wiedergefunden wurde. Niemand konnte hier etwas anderes annehmen, als daß der Aldehyd zunächst in 1-Stellung phosphoryliert wurde



und daß dann die Aldehydgruppe durch D.P.N. zur Carboxylgruppe dehydriert wurde. Diese Auffassung lag uns besonders nahe, da wir früher in rein chemischen Versuchen gefunden hatten[16], daß die Aldehydgruppe des Glycerinaldehyds durch Zusatz von Phosphat (ohne Zusatz von Fermenten) zu der neutralen wässrigen Lösung so aktiviert wird, daß sie von molekularem Sauerstoff zur Carboxylgruppe oxydiert wird. DOROTHY NEEDHAM[17] fügte später die Beobachtung hinzu, daß dabei D.P.N. den Sauerstoff ersetzen kann. Tatsächlich geht also das chemische Modell soweit, daß D.P.N. Glycerinaldehyd dehydriert, wenn man der neutralen wässrigen Lösung Phosphat aber keine Fermente zusetzt.

Demgegenüber wiesen die Polemiker auf die Möglichkeit hin, daß bei der biologischen Dehydrierung durch D.P.N., anders als bei der chemischen Dehydrierung, der 3-Phosphoglycerinaldehyd zuerst an das Fermentprotein gebunden und in dieser Bindung durch D.P.N. dehydriert werde; und daß erst dann die Phosphorsäure eingreife und das Protein von der Glycerinsäure verdränge, durch einen Vorgang, der als „Phosphorolyse" bezeichnet wurde.

Indessen gab es ein entscheidendes Experiment. Wenn die Theorie der Phosphorolyse richtig war, so mußte die Anfangsgeschwindigkeit der Dehydrierung unabhängig von der Phosphatkonzentration sein, während nach unsern Gleichungen der Phosphateinfluß von Anfang an vorhanden sein mußte. Das Experiment ergab, daß die Anfangsgeschwindigkeit von der Phosphatkonzentration abhängt, wie es unsere Gleichungen verlangen.

So wurde 1957 der Schlußstrich unter das Problem des chemischen Mechanismus der Gärungen gezogen. (*23*) (*24*).

IX. Krebszellen

Der wesentlichste Fortschritt auf diesem Gebiet seit 1945 war der Übergang von Tumoren zu Einzel-Zellen.

1. Ascites-Krebszellen (*17, 22, 35, 58*).

Unser erstes Einzellen-Material waren die Zellen des Ehrlichschen Ascites-Krebses der Mäuse, die man in großen Mengen als beständige, gut zentrifugierbare und fast reine Krebszellensuspensionen gewinnen kann. Ursprungsgewebe, Bindegewebe und Nekrosen waren nunmehr keine Fehlerquellen mehr bei Stoffwechselmessungen und die Gärungsgrößen stiegen auf das 2- bis 3fache der früher für die reinsten Tumoren gefundenen Werte. Erst jetzt konnte die 2-Gefäß-Methode, die qualitativ und quantitativ gleiches Zellmaterial in beiden Gefäßen verlangt, einwandfrei auf Krebszellen angewandt werden; erst jetzt konnte mit Krebszellen quantitativ experimentiert werden. Es war ein Fortschritt wie in der Chemie der Übergang von Gemischen zu chemisch reinen Substanzen.

2. Earle-Zellen.

Krebszellen als Suspensionen von Einzelzellen werden auch erhalten bei der Methode von W. EARLE, der tierische Zellen in großen Flaschen jahrelang auf der Schüttelmaschine schüttelt und dabei, wie schon vor ihm GOLDBLATT und CAMERON mit der alten Carell-Methode, normale Zellen in Krebszellen umwandeln kann.

Von besonderem Interesse für Stoffwechselversuche waren 2 Linien von Krebszellen, die EARLE aus einer einzigen normalen Zelle gezüchtet hatte und die sich spontan in 2 Linien von hoher und niedriger Virulenz getrennt hatten. DEAN BURK und seine Mitarbeiter WOOD, HUNTER und HOBBY haben den Stoffwechsel dieser beiden Linien gemessen und haben für die hochvirulente Linie eine hohe Gärung und eine kleine Atmung, für die niedrig-virulente Linie eine kleine Gärung und eine große Atmung gefunden. Wer bisher an der Bedeutung der Gärung der Tumoren gezweifelt hatte, konnte es von nun an nicht mehr tun (*36*).

3. Zellen nach Dulbecco-Vogt.

Die schnellste Methode, wachstumsfähige Körperzellen in großen Mengen als Einzelzellen zu gewinnen, ist die Methode von Dulbecco-Vogt, bei der tierische Gewebe mit einer verdünnten Trypsinlösung zerteilt werden.

Wir haben den Stoffwechsel derartiger Zellsuspensionen sofort nach der Zerteilung und nach dem Wachstum in vitro gemessen und haben für Nierenzellen von Kaninchen und Embryonen von Hühnern gefunden, daß der vorher rein aerobe Stoffwechsel beim Wachstum in vitro in den Gärungsstoffwechsel der Krebszellen umschlägt. Dabei vollzieht sich der Umschlag besonders schnell in den embryonalen Zellen, aus deren Stoffwechsel im Verlauf von 1 bis 2 Zellteilungen der voll ausgebildete Stoffwechsel der Krebszellen entsteht: eine große anaerobe Gärung, eine kleine Atmung und folglich eine große aerobe Gärung.

Da ein großer Teil der Einsaat in den Petrischaalen bei der in vitro-Kultur anwächst und da der Stoffwechsel nach wenigen Zellteilungen umgeschlagen ist, so muß nunmehr die Theorie der Krebsentstehung durch Selection, an die wir alle lange Jahre glaubten, durchaus und in jeder Form aufgegeben werden. Wir erklären diese Bereitschaft zur Anaerobiose durch die lange anaerobe Vergangenheit des Lebens, die offenbar von den Genen noch nicht vergessen ist (*59*, *61*, *63*, *67*, *71*).*

Die anaerobe Vergangenheit des Lebens erklärt vielleicht auch die bisher rätselhafte anaerobe Gärung der embryonalen Zellen, die bald nach der Gärung der Krebszellen gefunden worden ist und die keinen physiologischen Sinn hat,

---

* *Zusatz 1961.* Inzwischen haben wir gefunden, daß der Krebsstoffwechsel in vitro durch eine Substanz erzeugt wird, die das zugesetzte Kälberserum enthält und die ihm durch Aluminiumhydroxyd entzogen werden kann. In der Tat kann man nunmehr die embryonalen Zellen in vitro *ohne* Gärung oder *mit* Gärung wachsen lassen, je nachdem man das Serum mit Aluminiumhydroxyd behandelt oder nicht behandelt.

da die große Atmung der embryonalen Zellen die anaerobe Gärung im Körper immer zum Verschwinden bringt.

Es ist die auffallendste Eigenschaft dieser „latenten" Gärung, daß sie am Anfang der Entwicklung besonders groß ist und dann schnell abfällt, zum Beispiel in wenigen Tagen auf $^1/_4$ des Anfangswerts. Dieses ist das zeitliche Verhalten von Eigenschaften, die in der Phylogenese notwendig waren, aber später überflüssig geworden sind.

X. Wirkung der Röntgenstrahlen auf Krebszellen

Bestrahlt man unter sonst gleichen Bedingungen Krebszellen und embryonale Zellen mit Röntgenstrahlen und mißt die von den Strahlen bewirkte Abnahme des Stoffwechsels, so findet man, daß der Stoffwechsel der Krebszellen stärker abnimmt, als der Stoffwechsel der embryonalen Zellen. Da Krebszellen weniger Katalase enthalten als normale Zellen und da Röntgenstrahlen in wäßrigen Flüssigkeiten Wasserstoffperoxyd erzeugen, lag die Idee nahe, die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel als eine Vergiftung durch Wasserstoffperoxyd aufzufassen.

Zur Prüfung dieser Idee entwickelten wir, in Analogie zu unserm Aktinometer für das sichtbare Licht, das manometrische Röntgenaktinometer, in dem zunächst die zu prüfenden Zellen geschüttelt und bestrahlt werden und in dem dann unter den gleichen Bedingungen eine Fricke'sche Ferrosulfatlösung geschüttelt und bestrahlt wird, deren Ferro-Eisen durch die Bestrahlung in Ferri-Eisen übergeht. Wurde in jedem Versuch neben dem Stoffwechsel die oxydierte Eisenmenge bestimmt, so war, trotz komplizierter geometrischer Bedingungen, in jedem Versuch die wirksame Röntgendosis bekannt.

Um den Zusammenhang zwischen Strahlenwirkung und Wasserstoffperoxyd zu finden, setzten wir bei der Bestrahlung Katalase zu den Zellen und fanden dann eine geringere Strahlenwirkung. Oder, noch besser, wir bestrahlten zunächst die Lösungen ohne Zellen, gaben dann Katalase zu den bestrahlten Lösungen und setzten erst dann die Zellen zu. Wir fanden, daß die bestrahlten Lösungen die Gärung von Krebszellen fast wie die Bestrahlung verminderten; daß aber nach Zusatz von Katalase zu der bestrahlten Lösung die bestrahlten Lösungen nicht mehr auf die Gärung von Krebszellen wirkten.

Aus solchen Versuchen, die auch auf die Methämoglobinbildung durch Röntgenstrahlen ausgedehnt wurden, ergab sich, daß bei der Bestrahlung verdünnter Suspensionen von Krebszellen die Gärung im wesentlichen durch das gebildete Wasserstoffperoxyd gehemmt wird und nicht durch die H Atome und OH Radikale, die nach Joseph Weiß die primären Spaltungsprodukte des Wassers sind. Die Reaktionen, in denen Wasserstoffperoxyd bei der Bestrahlung gebildet wird

$$2\,OH = H_2O_2$$
$$2\,H + O_2 = H_2O_2$$

gehen also offenbar unter unsern Versuchsbedingungen schneller, als Reaktionen von H und OH mit den Gärungs-Fermenten.

XI. Photosynthese*

1. Versuchsmaterial.

Seit 1956 züchten wir Chlorella für Ausbeutebestimmungen nicht mehr in kontinuierlichem Licht, sondern in fluktuierendem Licht, dessen Hell- und Dunkelperioden dem Tag, der Nacht und den Dämmerungen entsprechen. Vor allem hierdurch, aber auch noch durch andere Maßnahmen sind die guten Quantenausbeuten zu jeder Zeit reproduzierbar geworden, während früher Einflüsse von dunkler oder heller Jahreszeit, Züchtung an Nord- oder Südfenstern usw. die Quantenausbeuten zu beeinflussen schienen. Diese Methode der Züchtung der Versuchszellen ist also von entscheidender Bedeutung für die Ausnutzung des Lichts in Chlorella.

2. Blaugrünes Licht.

1955 entdeckten wir, daß blaugrünes Licht bei der Photosynthese katalytisch wirkt. Andere sehr reine Spektralbezirke des sichtbaren Lichts sind ohne Zusatz kleiner Intensitäten von blaugrünem Licht bei der Photosynthese von Chlorella nicht oder nur sehr schlecht wirksam. Immer ist seitdem bei Messungen des Quantenbedarfs blaugrünes Licht zugesetzt worden.

Das Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts, ergab ein Maximum um 458 mμ und ist wahrscheinlich das Absorptionsspektrum eines Ferments. Methodisch gehört die Bestimmung dieses Wirkungsspektrums zu den physikalisch schwierigeren Aufgaben, da sie die 2-Teilung von 2 verschiedenfarbigen Strahlen und also die bolometrische Justierung von 4 Strahlen für jeden Punkt des Wirkungsspektrums erfordert, was nur in einem hochentwickelten Strahlungslaboratorium durchführbar ist.

3. Quantenbedarf der Photosynthese in Chlorella.

Bei einer Neubestimmung des Quantenbedarfs der Photosynthese im Jahr 1960 ist die Weiterentwicklung der Zellzüchtung, der Strahlungs- und Absorptionsmessung, der Manometrie sowie die Notwendigkeit des blaugrünen Lichts kleiner Intensitäten berücksichtigt worden. Tatsächlich ist von den alten Methoden aus der Zeit vor 1945 nicht mehr viel übrig geblieben. Vor allem sind die Versuchszeiten und damit die manometrischen Ausschläge, die fast ganz im positiven Druckgebiet liegen, nunmehr beliebig groß. Zudem hat man die Wahl zwischen der 2-Gefäß-Methode — falls man über die Einrichtungen zur Teilung der Lichtstrahlen verfügt — oder einer sehr einfachen 1-Gefäß-Methode, bei der die

---

* *Zusatz 1961.* 1960 erschien in den American Lecture Series (C. C. Thomas, Springfield, Ill.) "Problems in Photosynthesis" von W. Bladergroen. Seit vielen Jahrzehnten ist dies die erste konstruktive Darstellung des Gebiets. Es ist keine Reportage über Theorien, sondern eine Beschreibung von Experimenten und Methoden.

Kohlensäuredrucke durch räumlich von den Zellen getrennte Karbonatgemische konstant gehalten werden.

Zum Beispiel fanden wir für Chlorella*, wenn das Meßlicht rot und die Atmung mit blaugrünem Licht kompensiert war, mit Hilfe der neuen 1-Gefäß-Methode (vergl. Seite 582):

CO_2-Druck [mm Brodie]	$\left[\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Quanten}}{O_2}\right]$
8	21
31	6,9
75	3,6
140	2,83
202	2,75

Man beachte, wie wesentlich sich der Quantenbedarf mit dem Druck der Kohlensäure ändert und daß erst oberhalb eines Kohlensäuredrucks von 200 mm Brodie der Grenzwert des Quantenbedarfs erreicht ist, der beträgt:

$$\frac{1}{\varphi} = 2{,}75 \left[\frac{\text{Quanten}}{O_2}\right]$$

Es ist sehr nahe der energetisch mögliche Grenzwert, wenn die molare Spaltungsenergie der Kohlensäure 112000 cal beträgt; und es ist sehr nahe der Grenzwert, den wir mit der 2-Gefäß-Methode finden, was selbstverständlich erscheinen mag, aber wegen einer unsachverständigen Kritik der 2-Gefäß-Methode hier erwähnt werden mag.

Da im ganzen sichtbaren Spektralgebiet gleichviele vom Chlorophyll absorbierte Lichtquanten gleichviel Sauerstoff entwickeln, so können wir nunmehr den Energieumsatz im sichtbaren Licht hinschreiben, wenn wir mit einer molaren Spaltungsenergie der Kohlensäure von 112000 cal rechnen:

Wellenlänge des Lichts [mμ]	Energie-Umsatz $\left[\frac{\text{Chem. Energie-Gewinn}}{\text{Abs. Lichtenergie}}\right]$
436	$\frac{112000}{2{,}75 \times 65000} \times 100 = 62\%$
546	$\frac{112000}{2{,}75 \times 52000} \times 100 = 78\%$
680	$\frac{112000}{2{,}75 \times 42000} \times 100 = 96\%$

Historisch ist es von Interesse, daß die Quantenausbeute bei einem Kohlensäuredruck von 20 mm Brodie nur einen kleinen Teil der maximalen Quanten-

* *Zusatz September 1961.* In der Zwischenzeit ist bestätigt worden, daß der Quantenbedarf von Blättern viel größer ist, nämlich 15 bis 20 pro Molekül Sauerstoff (vergl. Seite 542). Wenn der Mechanismus der Photosynthese in Blättern der gleiche ist, wie in Chlorella, so reagiert also in Blättern ein viel größerer Bruchteil des primär entwickelten Sauerstoffs zurück.

ausbeute beträgt. 20 mm Brodie aber ist der Kohlensäuredruck gewesen, bei dem Emerson vor 20 Jahren den Quantenbedarf der Photosynthese bestimmte und einen Quantenbedarf von 10 bis 20 pro Molekül Sauerstoff fand. Emerson fügte die durch nichts begründete Behauptung hinzu, die bei dem Kohlensäuredruck von 20 mm Brodie gefundene Ausbeute sei die maximal mögliche Ausbeute, obwohl doch Chlorella nach unseren Vorschriften, die er befolgte, bei einem Kohlensäuredruck von 500 mm Brodie gezüchtet worden war.

Wahrscheinlich hätte niemand die Behauptung von Emerson ernst genommen, wenn nicht Franck und Gaffron[18] mit einer eigenen Thermodynamik bewiesen hätten, daß die von Emerson bei 20 mm Brodie gefundene Ausbeute tatsächlich die maximal mögliche sei.

Im Jahr 1949 bestimmte ich in Bethesda (U.S.A.) mit Dean Burk und mehreren amerikanischen Kollegen die Quantenausbeute bei einem Kohlensäuredruck von 500 mm Brodie mit der neuentwickelten Kompensationsmethode. In Übereinstimmung mit den früheren Dahlemer Versuchen wurde in langen Versuchsreihen ein Quantenbedarf von unter 4 gefunden (*5*, *6*, *8*).

Trotzdem blieben Franck und Gaffron, unterstützt durch Eugène Rabinowitsch, bei ihrer Thermodynamik und machen nunmehr seit 20 Jahren, ohne selbst Experimente zur Energetik der Photosynthese beizutragen, für die Behauptungen Emersons Propaganda.

4. 1-Quantenreaktion.

Wenn wir das Ergebnis unserer Ausbeutebestimmungen in die Gleichung

$$H_2CO_3 + 2{,}75\ h \cdot \nu = CH_2O + O_2$$

zusammenfassen, so ist klar, daß dies keine chemische Reaktionsgleichung, sondern nur eine Bilanz mehrerer Reaktionen sein kann. Denn die Photochemie kennt keine Mehrquanten-Reaktionen und alle photochemischen Vorgänge, ob biologische oder nichtbiologische, sind so lange problematisch, als die zugrunde liegende 1-Quantenreaktion nicht gefunden worden ist.

Dean Burk und der Verfasser haben im Jahr 1950 in Dahlem die 1-Quantenreaktion der Photosynthese gefunden, eine Reaktion, bei der 1 Lichtquantum 1 Molekül Sauerstoff entwickelt:

$$XO_2 + 1\ h \cdot \nu = X + O_2$$

wo XO_2 die Substanz ist, aus der sich der Sauerstoff entwickelt. Offenbar kann XO_2 nicht Kohlensäure sein, da man mehrere Quanten des sichtbaren Licht braucht, um den Sauerstoff aus der Kohlensäure zu entwickeln.

Der Weg, auf dem die 1-Quantenreaktion entdeckt wurde, sei hier kurz beschrieben. Als wir bei Ausbeute-Bestimmungen mit Chlorella die Ausbeute in der üblichen Weise aus der Differenz der manometrischen Ausschläge im Hellen und im Dunkeln berechneten, zeigte sich, daß wir um so bessere Ausbeuten erhielten, je kürzer die Perioden waren, in denen Hell- und Dunkel-Perioden aufeinander folgten, bis bei einer Folge von 1 Minute hell und 1 Minute dunkel ein Grenzwert der Ausbeute erreicht wurde, der sich bei weiterer Verkürzung der Hell- und

Dunkel-Perioden nicht mehr änderte. Dann entwickelte 1 Lichtquantum 1 Molekül Sauerstoff.

Bei derartigen Versuchen beobachteten wir ferner, daß bei der Verkürzung der Hell- und Dunkel-Perioden nicht nur die Sauerstoffentwicklung im Licht, sondern auch der Sauerstoffverbrauch im Dunkeln größer und größer wurde. So wurde zu der Entdeckung der 1-Quantenreaktion eine zweite Entdeckung hinzugefügt, die die energetische und chemische Erklärung der 1-Quantenreaktion anbahnte: daß das Substrat XO_2 der 1-Quantenreaktion durch eine Dunkelreaktion entsteht, bei der Extrasauerstoff verbraucht wird.

Viele günstige Umstände waren es, denen diese Entdeckungen zu verdanken sind, in erster Linie der hohe Kohlensäuredruck, der 10% einer Atmosphäre betrug*. Hätte der Kohlensäuredruck nur 2% einer Atmosphäre betragen, so wäre die 1-Quantenreaktion nicht entdeckt worden. Zu den günstigen Umständen gehörte ferner der Ersatz des Nitrats durch Ammoniumchlorid in der Suspensionsflüssigkeit der Chlorella; es gehörten ferner große Zellmengen in den Manometriegefäßen dazu, da die 1-Quantenreaktion keine katalytische, sondern eine stöchiometrische Zellreaktion ist; und es gehörte eine vollkommen entwickelte 2-Gefäß-Methode dazu, mit der man den Sauerstoffwechsel in 1 Minute noch hinreichend genau messen konnte. Wie auf andern Gebieten der Zellphysiologie, so war es auch hier die 2-Gefäß-Methode, mit der die entscheidenden Entdeckungen gemacht worden sind.

Später sind die Methoden zur Messung der 1-Quantenreaktion vereinfacht und verbessert worden. Alle Ergebnisse der ersten Arbeit, Experimente und Schlußfolgerungen, sind im Lauf der Jahre mit den neuen Methoden bestätigt worden (*47*).

5. *Wasser als Photolyt der Photosynthese?*

Die Theorie, daß die Photosynthese eine Photolyse des Wassers ist, stammt von Isotopenversuchen mit Chlorella, bei denen der Sauerstoff des Wassers markiert, aber der Sauerstoff der Kohlensäure nicht markiert war; und bei denen sich zeigte, daß der im Licht entwickelte Sauerstoff teilweise markiert war. Wegen der schnellen Hydratisierung der Kohlensäure in Chlorella beweisen jedoch diese Versuche in keiner Weise die Photolyse des Wassers.

Später glaubte R. Hill, die Photolyse des Wassers bewiesen zu haben, als er fand, daß Ferrioxalat aus Chloroplasten, *ohne Zufuhr von Kohlensäure*, Sauerstoff entwickelt. Da jedoch Ferrioxalat im Licht Kohlensäure entwickelt und da auch sonst bei den Versuchen Hills die Kohlensäure nicht ausgeschlossen war, bewiesen auch die Versuche von Hill die Wasserphotolyse nicht.

Tatsächlich war lange Zeit, von 1944 bis 1958, die einzige Stütze der Wasserphotolyse unsere Arbeit von 1944[19], in der gezeigt wurde, daß Chinon aus sorg-

---

**Zusatz 1961.* Da nur bei hohen CO_2-Drucken Chlorella mit dem Photolyten gesättigt ist; und da man die Quantenausbeute 1 nur finden kann, wenn Chlorella mit dem Photolyten gesättigt ist. Denn nur aus Chlorophyll, das mit dem Photolyten verbunden ist, kann absorbiertes Licht O_2 entwickeln.

fältig mit Wasser ausgewaschenen grünen Grana im Licht Sauerstoff entwickelt nach der Gleichung

$$2 \text{ Chinon} + 2\ H_2O = 2 \text{ Hydrochinon} + O_2$$

Hier schien der Weg über die Kohlensäure noch besser als durch Waschen der Grana dadurch ausgeschlossen zu sein, daß die Grana nicht imstande waren, aus zugesetzter Kohlensäure Sauerstoff zu entwickeln.

Bei einer genaueren Untersuchung der Chinonreaktionen mit neuen Methoden in den Jahren 1959 und 1960 fanden wir jedoch, daß Kohlensäure für den Ablauf der Chinonreaktionen notwendig ist, allerdings nur sehr wenig Kohlensäure, da die Kohlensäure bei den Chinonreaktionen nicht stöchiometrisch, sondern katalytisch wirkt. Tatsächlich unterscheiden sich die Chinonreaktionen von der Photosynthese in ihrem Verhalten gegenüber Kohlensäure nur dadurch, daß bei den Chinonreaktionen die reduzierte Kohlensäure durch überschüssiges Chinon immer wieder vollständig zu Kohlensäure zurückoxydiert wird, während bei der Photosynthese ein Teil der reduzierten Kohlensäure als „fixierte Kohlensäure" übrig bleibt. So war 1960 die einzige Stütze der Wasserphotolyse gefallen und mit ihr das ganze Gebäude der Theorien, deren Fundament die Photolyse des Wassers gewesen war.

Insbesondere haben wir es nie ernst genommen, daß die von uns entdeckte[20] Reduktion der Phosphoglycerinsäure durch Dihydro-Nikotinsäureamid diejenige Reaktion sein sollte, durch die die Kohlensäure bei der Photosynthese reduziert wird. Das Auftreten der Phosphoglycerinsäure in den Radiogrammen nach Belichtung war hinreichend erklärt durch die lichtinduzierte Atmung.

6. Der Photolyt der Photosynthese

Schüttelt man Chlorella aerob und im Dunkeln mit Kohlensäure, so wird Kohlensäure chemisch gebunden. Belichtet man nach Beendigung der Kohlensäureaufnahme, so verschwindet die aufgenommene Kohlensäure unter Entwicklung von Sauerstoff, bis Zersetzung und Aufnahme von Kohlensäure sich das Gleichgewicht halten und die Photosynthese stationär geworden ist. Die im Dunkeln sich anhäufende Kohlensäureverbindung, aus der der Sauerstoff entwickelt wird, nennen wir den Photolyten der Photosynthese.

Die Konzentration des Photolyten, die man in Chlorella maximal erreichen kann, hängt von dem Druck der Kohlensäure und der Zucht der Zellen ab. In den A-Zellen, die im Licht die besten Quantenausbeuten geben, ist die Sättigung mit dem Photolyten bei einem Kohlensäuredruck von 10 bis 20% einer Atmosphäre erreicht. Dann ist die Photolytkonzentration in der Regel gleich der Chlorophyllkonzentration.

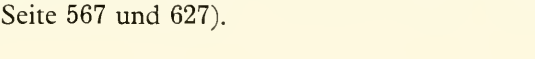
Der Photolyt bildet sich nur unter aeroben Bedingungen, wenn die Zellen atmen, und zerfällt unter Abspaltung von Kohlensäure, wenn man den Zellen den Sauerstoff entzieht.

Die Bildung des Photolyten wird gehemmt, wenn man die Zellen in Arseniat anstatt in Phosphat suspendiert, steigt aber wieder auf den Normalwert, wenn man zu der Arseniatlösung Phosphat zusetzt.

Der Gehalt an Photolyt steht zu dem Gehalt an Glutaminsäure in einer nahen Beziehung. Läßt man in der lebenden Chlorella die Glutaminsäure zu γ-Aminobuttersäure und Kohlensäure zerfallen, so zerfällt auch der Photolyt unter Entwicklung von Kohlensäure; mit der Re-Synthese der Glutaminsäure in der lebenden Chlorella wird auch der Photolyt zurückgebildet. In den A-Zellen, die im Licht die besten Quantenausbeuten geben, findet man in der Regel, daß die Photolytkonzentration gleich der Glutaminsäurekonzentration ist.

Alle die erwähnten Reaktionen der Bildung und des Zerfalls des Photolyten sind sehr schnelle Reaktionen, sie sind Teilreaktionen im Mechanismus der Photosynthese und haben mit den langsamen Reaktionen der Proteinsynthese, den Umaminierungen usw., nichts zu tun. Zum Beispiel beträgt die Halbwertszeit der Bildung des Photolyten beim Wechsel von anaeroben zu aeroben Bedingungen bei 20^0 5 Minuten.

Wahrscheinlich ist die erste Reaktion bei der Bildung des Photolyten die reversible Phosphorylierung der Kohlensäure durch das A.T.P. der Atmung



$$H_2CO_3 + ATP \rightleftharpoons HCO_3H_2PO_3 + ADP$$

eine Reaktion, die die Abhängigkeit vom Kohlensäuredruck und von der Atmung erklärt. Das gebildete Carboxyphosphat reagiert dann reversibel mit der Glutaminsäure, die entstandene Glutaminsäureverbindung reagiert reversibel mit dem Chlorophyll (vergl. Seite 567 und 627).

7. Die lichtinduzierte Atmung der Grana

Von den Eigenschaften der Grana seien hier die folgenden hervorgehoben:

1. Grana aus Blättern oder durch Beschallung von Chlorella gewonnen, haben keine Dunkelatmung.
2. Grana sind unfähig, im Licht reduzierte Kohlensäure zu fixieren.
3. Die Sauerstoffentwicklung aus belichteten Grana wird durch Blausäure nicht gehemmt.

Es sei hinzugefügt, daß die Atmung der Chlorelle sehr leicht, zum Beispiel durch wenig Chinon, zerstört werden kann und daß Chlorella dann folgende Eigenschaften der Grana annimmt: daß sie zwar im Licht noch Sauerstoff entwickeln kann, aber unfähig zur Fixierung reduzierter Kohlensäure und unfähig zur Blausäurehemmung wird.

Es war das Hauptproblem der Granareaktionen, wie es energetisch möglich ist, daß die Grana aus Kohlensäure Sauerstoff entwickeln, obwohl ihnen doch keine Atmungsenergie zur Umwandlung der Kohlensäure in den Photolyten zur Verfügung zu stehen scheint. Die Antwort ist, daß die Grana zwar keine Dunkelatmung haben, daß sie aber eine durch Licht induzierte Atmung haben.

Ist Chinon — ein natürliches oder ein zugesetztes Chinon — der Oxydationskatalysator, so sind die Gleichungen der lichtinduzierten Atmung:

	$2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O + C = 2\ \text{Hydrochinon} + CO_2$	[1]
	$O_2 + 2\ \text{Hydrochinon} = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O$	[2]
Bilanz	$C + O_2 = CO_2$	[3]
Licht	$CO_2 = C + O_2$	[4]
Bilanz	$0 = 0$	[5]

Wie aber kann man, unter den Umständen dieser Bilanz, die lichtinduzierte Atmung der Grana nachweisen und messen? Im Dunkeln kann man sie nicht nachweisen, da sie im Dunkeln nicht vor sich geht. Im Licht kann man sie nicht nachweisen, da die gebildete Atmungskohlensäure im Licht gemäß Gleichung [4] in $C + O_2$ gespalten wird.

Trotzdem ist es gelungen, die lichtinduzierte Atmung zu messen. Gibt man nämlich soviel Blausäure zu den belichteten Granasuspensionen, daß die Katalase der Grana gehemmt wird, so wird nunmehr in Reaktion [2] die doppelte Menge Sauerstoff verbraucht:

$$2\ O_2 + 2\ \text{Hydrochinon} = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O_2$$

und für jedes Molekül Sauerstoff, das im Licht entwickelt wird, entstehen 2 Moleküle Wasserstoffperoxyd. Dann wird die Bilanz von [1] bis [5] nicht Null, sondern sie wird:

$$O_2 + 2\ H_2O = 2\ H_2O_2$$

so daß man nunmehr die lichtinduzierte Atmung der Grana durch Verbrauch von Sauerstoff und Bildung von Wasserstoffperoxyd messen kann — eine Methode, die man dem glücklichen Umstand verdankt, daß die Sauerstoffentwicklung in den belichteten Grana durch Blausäure nicht gehemmt wird.

Dies ist die Methode, mit der die lichtinduzierte Atmung der Grana entdeckt worden ist und mit der bewiesen worden ist, daß auch in den Grana die Sauerstoffentwicklung aus Kohlensäure quantitativ mit Oxydationsprozessen gekoppelt ist. Das Energieproblem der Granareaktionen war damit gelöst.

Die Entdeckung der lichtinduzierten Atmung erlaubt es nun auch, die Nichtfixierung der reduzierten Kohlensäure bei den Granareaktionen in einfacher Weise zu erklären. Man braucht nur anzunehmen, daß in den Grana die Oxydation der reduzierten Kohlensäure schneller geht als die Reduktion der Kohlensäure, während in Zellen die Reduktion schneller geht als die Oxydation, und man versteht, warum in Zellen, aber nicht in Grana, beim Verdunkeln reduzierte Kohlensäure übrig bleibt, das heißt, warum in den Zellen aber nicht in den Grana Kohlensäure fixiert wird.

Introduction*

Motto: «De fixer les objets longtemps sans etre fatigué.»

General remarks about our methods and their applications

As a co-worker of EMIL FISCHER, I prepared the first optically active peptides in the years from 1903 to 1906, and thereby, as one who belonged to the inner circle of his co-workers, I came to know the methods and experimental techniques of this greatest organic chemist of our times. Later on I began work on the quantum requirement of photosynthesis in the radiation laboratory of the Physikalisch-Technische Reichsanstalt, where my father EMIL WARBURG was president from 1906 to 1922. From the experiments of this laboratory, MAX PLANCK derived his law of radiation and calculated "the quantum of action", $h = 6.55 \cdot 10^{-27}$ erg · sec. In the same laboratory EMIL WARBURG measured the first quantum yields of photochemical reactions.

Thus it came about that in the Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie the methods of two widely separated fields, those of radiation physics and organic chemistry, were united in one hand. The result was the elucidation of the chemical mechanism of enzyme action — the very fast intermediate reactions of protein-bound active groups, that we were able to separate from the enzymes and to crystallize. Coenzymes and many vitamins proved to be nothing else than free active groups of enzymes.

Here are some examples to illustrate the interplay of physical and chemical methods that is characteristic of our institute.

By the methods of radiation physics the substance was discovered, that reacts in the living world with the molecular oxygen. By the methods of organic chemistry this substance which is an iron compound was isolated and crystallized. — By the methods of radiation physics the acting groups of the hydrogen-transferring enzymes were discovered, by the methods of organic chemistry these acting groups were separated and crystallized. — From the interaction of the oxygen- and hydrogen-transferring enzymes resulted the respiratory chain — the general solution of the problem of Lavoiser's respiration. — By the methods of radiation physics the main reaction of fermentations was recognized as a hydrogen transfer by nicotinamide, by the methods of organic chemistry 1, 3, Diphosphoglyceric acid has been isolated from yeast, the reactions of which explain the production of phosphate energy in fermentations. — By methods of physics the fermentation of cancer cell was discovered and the de-differentiated growth of cancer cells was explained by a type of energy transformation at a time when the atmosphere of the earth did not yet contain oxygen—a result, which explained the ultimate cause of cancer by the anaerobic past of life.

---

* The italicized figures in this introduction are the reference numbers of the papers listed in the previous table of contents.

* Other literature references (superscripts) are quoted in this introduction only when older works of the author or works of other authors are being cited.

The methods of radiation physics were employed to measure the quantum requirement of photosynthesis. It was found that in Chlorella somewhat less than three light quanta are necessary to split 1 CO_2 into $C + O_2$; this means that in red light there is an almost complete conversion of light energy into chemical energy. In this energy tranformation 1 light quantum splits off 1 molecule of oxygen from the photolyt which is a carbonic acid, transformed by the energy of respiration; 2/3 of the produced C and O_2 enter into a back reaction so that, in the net balance, three light quanta split one molecule of carbon dioxide. Thus the problem of the multiquanta reactions no longer exists in photosynthesis. The process of photosynthesis is part of the ordinary photochemical reactions of the nonliving world. On this basis, the special chemistry of photosynthesis is nowadays being investigated with the methods of manometry and organic chemistry; our findings in general energetics have thereby found excellent confirmation.

The best physical and chemical methods, however, would not have been able to advance cell physiology, had they not been combined with a simplification of the biological technique. Instead of measuring the flow of blood through the surviving organs, the use of thin tissue slices was introduced; instead of tissues, single cells were employed later. Red blood cells—nonnucleated ones of mammals, and nucleated ones of birds—were the first objects used to investigate the chemical mechanism of cell respiration. Instead of green leaves employed to study photosynthesis, unicellular green algae were introduced; the algae were sometimes replaced by the green grana of spinach chloroplasts or the even much smaller green grana of Chlorella, produced by exposure to sound waves. In the investigation of cancer cells, ascites cancer cells were substituted for tumors; whole animal cells were replaced by the grana of liver cells as early as 1914[1]. In all this experimentation it was always our aim to simplify the technique and to attain a speed and precision comparable to the methods of volumetric chemical analysis. With complicated methods we have never discovered anything significant.

SPECIAL PART

I. Optical measurement of hydrogenation and dehyrogenation

No one who has not worked in biochemistry before the hydrogentransferring function of nicotinamide was discovered can fully appreciate the significance of a method that is based on the absorption of light by the dihydropyridine nucleotides in the near ultraviolet range, at 340 mμ. It is no exaggeration to say that this method has reduced the time previously required for detecting and measuring the most important metabolic reactions to about onehundredth. The method is not limited to hydrogenation and dehydrogenation but can be extended to degradations, phosphorylations, and all processes that can be coupled in any way with hydrogenation or dehydrogenation. Paper (*2*) in this collection illustrates the foregoing for fermentation reactions.

If c is the concentration of dihydronicotinamide, d the path of light of wavelength 340 mμ, and β the absorption constant of the dihydronicotinamide, then

$$ln \frac{i_0}{i} = \beta \times c \times d$$

If we express c in micromoles per cubic centimeter and d in centimeters, the dimension of β becomes square centimeters per micromole. The numerical value of β

$$\beta = 14 \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mole}} \right]$$

is one of the most important and most frequently used quantities in biochemistry. If this value is known, one may immediately derive from it, by means of the following expression, the number of micromoles of hydrogen per cubic centimeter that were transferred in any one liquid, provided $\frac{i_0}{i}$ has been measured:

$$\Delta c = \frac{1\, ln \frac{i_0}{i}}{\beta \times d} \left[\frac{\mu\text{mole}}{\text{cm}^3} \right]$$

For instance, if $\frac{i_0}{i} = 2$ and $d = 1$ cm, then

$$\Delta c = \frac{\Delta 1\, ln \frac{i_0}{i}}{\beta \times d} = \frac{0{,}7}{14} = 0{,}05 \left[\frac{\mu\text{mole}}{\text{cm}^3} \right]$$

from which it may be seen that the optical method is very sensitive, approximately 10 times as sensitive as our biological manometry.

The directions for carrying out this method have not changed since 1935[2], since the function and the UV-bands of dihydronicotinamide were discovered. However, this method did not become generally accessible until our photoelectric cell was replaced by the spectrophotometer of BECKMAN and Zeiss-Oberkochen and until the firm of BÖHRINGER began to market pure metabolic enzymes.

Nicotinamide cannot be synthesized in adequate amounts in the human body and is, therefore, a vitamin indispensable to man. It is less known that nicotinamide is also a therapeutically effective chemical. Ten years after the discovery of the physiological function of nicotinamide, in 1945, VITAL CHORINE[3] found that tubercular guinea pigs and leprous rats could be healed by the use of nicotinamide, whereby 0.3 to 1 g per kg of body weight was sufficient to effect a cure. *Free nicotinic acid proved therapeutically ineffective.* This action of nicotinamide, a completely nontoxic substance, a component of hydrogen-transferring enzymes, was responsible for the testing of nicotinamide and its isomers and homologs with regard to the effect of these compounds on human tuberculosis. The result of this work was the discovery by GERHARD DOMAGK of the action of isonicotinic acid hydrazide, the most effective remedy against human tuberculosis today.

II. Manometry

Complicated manometric equipment, such as was used to measure the quantum requirement of photosynthesis—differential manometers, readings by means of the cathetometer-microscope, the rotary motion of round vessels—was replaced in 1945 by simple manometers, readings with the unaided eye, and the straight-line motion of rectangular vessels (*8*). The transition in the motion of the manometric vessels from circular to rectilinear caused one of the principal sources of error in manometry to disappear, i. e., the formation of foam when the vessels are shaken. A cell suspension, formerly full of bubbles after being shaken for no more than 1 hour, is today free of bubbles after being shaken for 24 hours. This enabled us to change over to experiments of any desired duration and, thereby, to obtain manometric effects of any desired magnitude—an example of what may be achieved by means of apparently minor modifications in technique. If irradiated manometric vessels moving in a straight line run the risk, at the end of their paths, of moving beyond the beam of light, this can be prevented by the use of mirrors that are attached to and move along with the manometers.

Metabolism measurements in serum have also become simplified, because the complicated calculation of carbon dioxide retention has been replaced by a simple direct method of determination.

The introduction of the new "side chamber" and "trough" vessels, which will completely displace the older types of manometric vessels, represents a decisive advance in manometry (*41*, *42*, *72*). Carbonate-bicarbonate mixtures put into the side chambers maintain constant pressures of carbon dioxide within the entire side-chamber vessels, over the range of 0.3 to 600 mm Brodie; cells maintained in their physiological environment in the main compartment of the vessel can thus no longer be damaged by the carbonate mixtures in which they formerly were suspended. This method constitutes the solution of the oldest problem of biological manometry: to determine the oxygen metabolism under physiological carbon dioxide pressures by means of *one* vessel. It obviates the use of the two-vessel method in all cases in which the carbon dioxide is of no interest. The new manometric vessels may be obtained from Aminco, Silver Springs, Maryland, USA.

The new procedure has already been employed to determine the quantum requirement of photosynthesis with only *one* irradiated vessel. It has also been employed to determine the oxygen consumption of cancer cells; the respiration of these cells is determined only inaccurately by means of the two-vessel method because of the cells' large aerobic fermentation.

The new *trough vessels* are conical and have insets that are located within the upper third, rather than at the bottom, of the main vessel. These trough insets are no longer shaped like cylinders but rather like flat troughs. They are connected to a sidearm, from which substances may be introduced into the trough; a second sidearm is connected to the main vessel rather than to the trough.

If we mix in the trough via its sidearm, substances that are neutral and that do not become alkaline until they are mixed, we can determine the carbon dioxide content of the manometric vessel. If the cell suspension in the main compartment of the vessel is first acidified via the second sidearm, and the contents of the trough are only then made alkaline, the total carbon dioxide in the manometric vessel can be determined. If we mix in the trough substances which, upon contact with one another, give off oxygen without a simultaneous change in the pressure of carbon dioxide—for instance, catalase and hydrogen peroxide—we can make the transition from anaerobic to aerobic conditions without opening the vessel. If, on the other hand, we mix in the trough substances that, upon contact with one another, absorb oxygen, without the reaction becoming alkaline, we can make the transition from aerobic to anaerobic conditions without opening the vessel.

Of the application of trough vessels to date we should like to mention the measurement of the fixation of CO_2 in green cells, a determination that can be made much more reliably and precisly by the use of through vessels compared to the usual C^{14} methods. We should further like to mention the measurement of the uptake of carbon dioxide by Chlorella as a result of the transition from anaerobic to aerobic conditions, as well as the measurement of the evolution of carbon dioxide by Chlorella on transition to anaerobic conditions. In addition, we should like to mention the measurement, in a *single* vessel, of the retention of carbon dioxide and lactic acid.

III. Radiation measurement (Bolometer)

The bolometer in use today was developed at the Physikalisch-Technische Reichsanstalt by LUMMER and KURLBAUM. It is an instrument that has a great past; with it LUMMER and PRINGSHEIM[4] measured the radiation of black bodies. From their experiments in 1900, PLANCK[5] derived his formula for radiation in 1900 and calculated the constant h ($h = 6.55 \cdot 10^{-27}$ erg · sec, as compared to today's value of $h = 6.63 \cdot 10^{-27}$ erg · sec). It is the same instrument with which EMIL WARBURG[6] in the years 1911 to 1930 laid the foundations of quantitative photochemistry.

The bolometer has one advantage that distinguishes it from all other instruments for the absolute measurement of radiation: If one permits a beam of light to fall on the platinum strips of the bolometer and then shifts the beam over the surface of the

bolometer, the electrical response of the bolometer remains constant; whereas, if a ray is shifted along the surface of a thermopile, the deflections of the galvanometer change so considerably that absolute radiation measurements are impossible.

We have simplified (*11*) the calibration of the bolometer by substituting for the Hefner lamp the calibrated carbon-filament lamp of the Bureau of Standards in Washington. If, during calibration, the bolometer opening is covered by means of a lithium fluoride window rather than a quartz window, no corrections need be made for selective absorption; correction must be made only for the reflection of the standard light.

As light sources we use the mercury and xenon high-pressure lamps manufactured by the Osram A.G., or 500-watt metal-filament lamps that have a small area of intense brightness. Nowadays we rarely employ monochromators to isolate the spectal regions but, most of the time, use colored glass filters and interference disks. We test each spectral region before using it for measurements of photosynthesis, employing a solution of 1 mg/cm^3 ethyl chlorophyllide in pyridine; the solution should not transmit any light in a layer of 1-cm thickness.

Another contribution to the development of radiation methods (*11*) is the splitting of light beams by means of prisms or of mirrors that permit only partial transmission; and the bolometric adjustment of the two parts to the same intensity, as is required in the two-vessel method. This technique has been improved in such a way for the measuring the absorption of the blue-green action spectrum of photosynthesis, that it became possible to add, to two red beams of equal intensity, two blue-green beams of equal intensity.

IV. Radiation measurement (Quantum actinometer) (*4*)

In addition to using the bolometer for absolute radiation measurements, we developed the quantum actinometer for special purposes, In this instrument, oxygen is transferred to thiourea by chlorophyllide or pheophorbide and the oxygen absorbed is measured manometrically. If the quantum intensities are below a certain threshold, the amount of oxygen consumed when one light quantum is absorbed is almost exactly one molecule.

If monochromatic light beams are to be measured, the bolometer is to be preferred to the actinometer. But if diffuse light is to be measured, the actinometer is preferred. The actinometer may also be used to measure the sum of light intensities that are not constant, since the actinometer integrates the intensities of the absorbed light.

V. Radiation measurement (Absorption measurement) (*25*)

The most difficult part of the determination of the photosynthetic yield by radiation measurements was the measurement of the light absorption in the turbid media of the cell suspensions. Our first solution of the problem consisted

in putting so many cells into the manometric vessels that the radiated light was completely absorbed. But the great respiration of these many cells was inconvenient. Nowadays the respiration is compensated for by means of diffused blue-green light before the incident light is allowed to irradiate the manometric vessel; therefore, extensive respiration no longer presents an obstacle to the application of the method of complete absorption.

Incomplete absorptions we measured first by means of the quantum actinometer, which we placed around the manometric vessel containing the cells. Later we developed an Ulbricht sphere for measuring incomplete absorptions; in the center of the sphere the manometric vessels were moved about and irradiated as they were in the yield determinations. If the photomultiplier built into the surface of the sphere showed the deflection i_0 for white cells and i for green cells, the fraction of irradiated light absorbed by the green cells was

$$a = \frac{i}{i_0}$$

Thus, it is now possible to measure both very small and very large quantities of absorbed light that is to determine the yields of photosynthesis for very dilute as well as very dense suspensions of cells. The fact that we found almost the same quantum yield for 5% light absorption as for 100% light absorption may be considered a confirmation of the reliability of our methods of absorption measurement.

As may be gathered from all the aforesaid, two instruments are required for measuring light absorption: one instrument to measure the incident quanta, and another to measure the absorbed fraction of the incident quanta. A bolometer and an Ulbricht sphere are examples of such instruments. Because both CALVIN and DANIELS used the bolometer quite incorrectly, we should like to point out that this instrument is not suitable for measuring light absorption (*34*) by light-scattering suspensions.

VI. Metallo-enzymes (*2*)

The role of iron or copper in oxygen-transferring enzymes has been completely explained from a chemical point of view by a valence change of these metals. However, there is a second type of metallo-enzyme, in which the function of the metal is not a valence change, e.g., when zinc is effective or when several metals are interchangeable with one another. A metallo-enzyme of this type is yeast zymohexase, which splits hexosediphosphate into triosephosphate and which is activated by zinc, cobalt, or iron.

The method we introduced in 1938 for the detection of functional heavy metals in enzymes is not an analytical one, since the high molecular weights of the enzymes make analytical results uncertain and since analysis does not give an explanation of the function of metal. Instead, our method consists in removing the metal by dialysis against complexing substances, e.g., phenanthroline, and in resynthesizing the enzymes by addition of metals. Many functional heavy metals have been dis-

covered by this method since 1938 and it seems to become increasingly evident that heavy metals contribute to the action of most enzymes. Obviously the long polemics directed against the first functional heavy metal that was discovered—the iron of iron oxygenase—was an attack that could not have been more unjustified.

The chemical mechanism of the function of metals in the metallo-enzymes of the second type is still unknown. One of the mysteries of enzyme chemistry is the fact that of the zymohexases we have crystallized, yeast zymohexase is a metallo-enzyme but muscle zymohexase is not.

VII. Respiration (*19*)

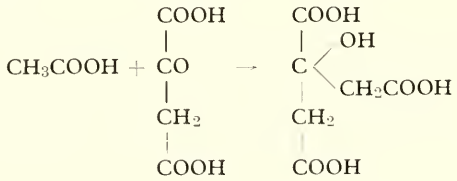
Since the active groups of the oxidizing and reducing enzymes and their chain reactions have been discovered[7],

[1] $O_2 \rightarrow$ iron oxygenase $\rightarrow$ cytochrome $\rightarrow$ flavin $\rightarrow$ nicotinamide

[2] $O_2 \rightarrow$ copper oxygenase $\rightarrow$ orthoquinone $\rightarrow$ nicotinamide

the question has been discussed whether these pathways provide a complete explanation for the mechanism of biological oxidation and reduction or whether they are valid for only a limited number of substrata—for the initial attemps at *in vitro* oxidation by enzymes of, for instance, fatty acids and the so-easily-combustible acetic acid, were unsuccessful.

Coenzyme A, which LIPMANN[8] discovered in 1945, supplied the answer to this question. In 1951 LYNEN[9] discovered that coenzyme A acts through its SH group, which forms thioesters with organic acids and thereby makes the acids capable of reacting with the components of the enzyme chains. Flavoproteins dehydrogenate Coat bound fatty acids[10]; the β-hydroxy acids thus formed are dehydrogenated to keto acids by pyridine proteins. The latter dehydrogenate the CoA-bound pyruvic acid to acetyl CoA, whose acetic acid constituent then combines with oxalacetic acid to form citric acid:



In the citric acid cycle discovered by H. A. KREBS[11], the equivalent of the acetic acid is oxidized to carbon dioxide and water, and at the same time oxalacetic acid is formed once more. The enzymes, which effect these oxidations within the cycle—the oxidation of isocitric acid, ketoglutaric acid, succinic acid, and malic acid—are none other than the pyridine proteins, flavoproteins, and heme proteins.

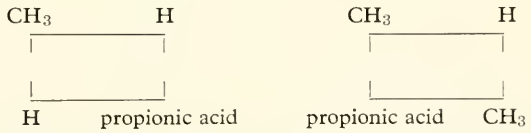
Many similar examples could be cited today. Indeed, all the biological hydrogenations and dehydrogenations that we know of are effected by reactions of members of our enzymatic chains. Thus they provide the universal and complete solution to the problem of biological oxidation and reduction.

If we ask why substrates are "activated" by combination with coenzyme A, I should like to point out that coenzyme A contains triply phosphorylated adenine, which also occurs in triphosphopyridine nucleotide and, serves to bind the nucleotide to the enzyme proteins. I should mention further that phosphate is generally the group that binds substrates and coenzymes to the enzyme proteins, as has been discovered by a comparison, for instance, of the reactivities of phosphorylated and nonphosphorylated glyceraldehyde or phosphorylated and nonphosphorylated lactoflavin. The idea thus readily suggests itself that the coenzyme A fixation may be interpreted as a phosphorylation which proceeds, although not directly, via the pantothenic bridge. This is supported by the fact that substrates such as glucose phosphate or triosephosphate, which already are phosphorylated, do not require coenzyme A. On the other hand, it is true that there are nonphosphorylated substrates, such as acetaldehyde and pyruvic acid, which combine with enzyme proteins and are subsequently hydrogenated by nicotinamide without any intermediary action on the part of coenzyme A.

In the field of respiration, the crystallization of the prosthetic group of iron oxygenase, the "cytohemin", constituted significant progress (*13*, *24*, *25*, *26*). This substance which in the living world transfers the oxygen thus was chemically isolated and became accessible to chemical investigation. Cytohemin, like blood hemin, contains two propionic acids; unlike blood hemin, it contains a formyl group but, only one vinyl group. Also unlike blood hemin, cytohemin contains a side chain having a molecular weight of the order of magnitude of 200; this side chain is responsible for its lower contents of iron and nitrogen as compared to the iron and nitrogen contents of the blood hemin. A comparison of the elementary analyses of these two chlorferri compounds yielded the following percentages:

	C	H	N	Fe	Cl
Cytohemin	64.47	6,79	6.50	6.42	4.20
Blood hemin	62.63	4.94	8.59	8.40	5.43

On fusion with resorcinol, cytohemin yields a "deuterohemin" that forms beautiful crystals and that contains three free β positions. S. F. MacDonald[12], a student of Hans Fischer, who took over the study of this important substance, proposes the following structure for "cytodeuterohemin":



The structure of the quinone in the enzymatic chain [2] (above) is still unknown, That of dehydrogenated chlorogenic acid, an ester formed by 3,4-dihydrocinnamic acid and quinic acid, is open to question, at least in the case of plants. Martius[13] assumes that naphthoquinone proteins are generally members of the enzymatic chains.

VIII. Fermentation (*2*)

If ARTHUR HARDEN[14] is right, that the oxido-reduction of fermentations is the main reaction of fermentations because by the oxidation-reduction the meaning of the fermentations is fulfilled, then 1939 was the year the chemical mechanism of fermentations was discovered. In 1939 at Dahlem the chemical reactions were discovered[15] by which triosephosphate is oxidized to pyruvic acid and pyruvic acid is reduced to lactic acid:

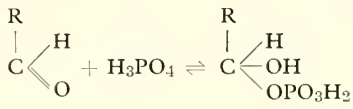
(I) 3-Phosphoglyceraldehyde + $H_3PO_4 \rightleftharpoons$ 1,3-diphosphoglyceraldehyde
(II) 1,3-Diphosphoglyceraldehyde + DPN $\rightleftharpoons$ 1,3-diphosphoglyceric acid + $DPNH_2$
(III) 3-Phosphoglyceraldehyde + H_3PO_4 + DPN =
(Balance) 1,3-Diphosphoglyceric acid + $DPNH_2$

1,3-Diphosphoglyceric acid is then dephosphorylated by ADP (adenosine diphosphate) to pyruvic acid, and the latter is hydrogenated to lactic acid by the $DPNH_2$ formed in reaction (II). All these reactions occur *in vitro* upon addition of the pure substrate and the crystallized enzymes to one another.

1,3-Diphosphoglyceraldehyde is the only one of these compounds which we did not isolate, because 1,3-diphosphoglyceraldehyde in aqueous solution hydrolyzes to 3-phosphoglyceraldehyde and H_3PO_4. Thus, in the entire chemical mechanism of fermentations, there remained in 1939 one single sustance about which it was possible to quarrel.

Therefore began the long argument about 1,3-diphosphoglyceraldehyde. MEYERHOF initiated the fight in 1943 and LIPMANN and many distinguished biochemists followed suit. Because the question at issue—the mechanism of fermentations—was a biochemical problem that had resisted solution for a hundred years, the course of this controversy may be described.

The fact that needed explanation was that 3-phosphoglyceraldehyde was dehydrogenated only in the presence of phosphate and that, after dehydrogenation, the added phosphoric acid turned up in the 1-position of the 3-phosphoglyceric acid. No one could come to any conclusion other than that the aldehyde was first phosphorylated in the 1-position



and that the aldehydic group was subsequently dehydrogenated to a carboxyl group by means of DPN (disphosphopyridine nucleotide). Because of earlier experimental results, this interpretation struck us as particularly plausible. In purely chemical experiments we had found[16] that the aldehyde group of the glyceraldehyde is activated by the addition of phosphate to the neutral aqueous solution without enzymes to such a degree that it is oxidized to the carboxyl group by molecular oxygen. DOROTHY NEEDHAM[17] later made the observation that DPN can replace the oxygen in this reaction. Thus, in the chemical model DPN actually dehydrogenates glyceraldehyde, if phosphate is added to the neutral aqueous solution.

The polemicists pointed to the possibility that in the case of biological dehydrogenation by DPN, as opposed to chemical dehydrogenation, the 3-phosphoglyceraldehyde bound to the enzyme protein, be dehydrogenated by DPN; and that the phosphoric acid reacts only afterwards, displacing the protein from the glyceric acid by means of a process that was called "phosphorolysis".

In the meantime, a decisive experiment was made. If the theory of phosphorolysis was correct, the initial velocity of dehydrogenation had to be independent of the phosphate concentration; according to our equations, however, the phosphate had to exert its influence from the beginning. The experiment showed that the initial velocity depends on the phosphate concentration, as required by our equations.

This is how the last problem of the chemical mechanism of fermentations was solved in 1957 (*23*, *24*).

IX. Cancer cells

The transition from tumors to single cancer cells constituted the most essential improvement in this field since 1945.

1. Ascites carcinoma cells (17, 22, 35, 58)

Our first unicellular material consisted of the cells of the EHRLICH ascitic carcinoma of mice. These cancer cells were available in large amounts in the form of stable, easily centrifuged, and almost pure suspensions. Thus, tissue from the original organ, connective tissue, and necrotic tissue no longer constituted sources of error in measurements of metabolic rate, and fermentation rates rose to values two- to three-times higher than those found earlier in the case of even the purest tumors. The two-vessel method, which requires the use of equal amounts of identical cell material in both vessels, only then became truly applicable to cancer cells; quantitative experimentation with cancer cells only then became possible, a progress comparable to the transition from mixtures to chemically pure substances in chemistry.

2. Earle cells

Cancer cells as suspensions of single cells may be obtained by the method of W. EARLE who uses a shaking machine to agitate cancer cells (contained in large bottles) over a period of years. Like GOLDBLATT and CAMERON in experiments with the CARREL method, EARLE succeeded with his new method to transform normal cells to cancer cells.

Two lines of cancer cells were of special interest for use in metabolism tests: These two lines, one of high virulence and the other one of low virulence, had separated spontaneously from a culture EARLE had prepared from a single normal cell. DEAN BURK and his collaborators, WOOD, HUNTER and HOBBY, have measured

the metabolic rates of these two lines. In the highly virulent line they found extensive fermentation and limited respiration; in the line of low virulence, limited fermentation and extensive respiration. Anyone who, until then, may have doubted the significance of the fermentation of tumors, could no longer do so (*36*).

3. Cells according to Dulbecco-Vogt

The fastest technique to prepare large amounts of single cells from body cells that are capable of growth is the method of DULBECCO-VOGT, in which a suspension of animal tissues is made by addition of a dilute solution of trypsin.

We have measured the metabolism of such cell suspensions immediately after preparation and after *in vitro* growth and have found that the purely aerobic metabolism of rabbit kidney cells and of chick embryonic cells changes during growth *in vitro* into the fermentation metabolism of cancer cells. In the case of embryonic cells this conversion proceeds with special rapidity. Within one to two cell divisions their metabolism changes to the fully developed metabolism of cancer cells, characterized by extensive anaerobic fermentation, limited respiration, and, consequently, extensive aerobic fermentation.

Since a large part of the inoculum in the Petri dishes grows in the *in vitro* culture and since the metabolism changed after only a few cell divisions, the theory of carcinogenesis by selection (in which all of us believed for many years) must be definitely and totally abandoned. We interpret this readiness for anaerobiosis by the long anaerobic history of living matter, a history which evidently the genes have not yet forgotten (*59*, *61*, *63*, *67*, *71*, *76*).*

The anaerobic past of living matter may also explain the anaerobic fermentation of embryonic cells. This fermentation was discovered soon after that of the cancer cells but has no physiological significance, because the extensive respiration of embryonic cells always eliminates any anaerobic fermentation by them in the body.

The most striking property of this "latent" fermentation is that it is especially strong in early development but then decreases rapidly, for example, to one-fourth of its initial value within a few days. This is the behavior of properties that were necessary in phylogenesis but that later became superfluous.

X. Effect of X-rays on cancer cells

If cancer cells and embryonic cells are irradiated with x-rays under otherwise equal conditions, and if the decrease in metabolism caused by the rays is measured, the reduction in the metabolism of cancer cells is found to be greater than in the case

---

* *1961 Addition.* In the meantime, we have discovered that the metabolism characteristic of cancer is produced *in vitro* by a substance present in added calf serum; this substance can be removed from the calf serum by addition of aluminum hydroxide. Indeed, embryonic cells may now be grown *in vitro*, *with* or *without* fermentation, depending on whether the serum is treated with aluminum hydroxide or not.

of embryonic cells. Since cancer cells contain less catalase than normal cells, and since hydrogen peroxide is produced in aqueous solutions upon irradiation with x-rays, the obvious explanation was to regard the effect of x-rays on metabolism as a process of hydrogen peroxide poisoning.

In order to test this theory we developed the manometric x-ray actinometer (analogous to our actinometer for visible light), in which the test cells are first shaken and then irradiated and in which a FRICKE's solution of ferrous sulfate is subsequently shaken and irradiated under the same conditions. As a result of the radiation, ferrous iron is transformed into ferric iron. If, in addition to making the metabolic determination, one assays the amount of iron oxidized in each experiment, the effective x-ray dosage becomes known in each instance, regardless of complicated geometrical conditions.

In order to find the connection between the radiation effect and hydrogen peroxide, we added catalase to the cells during irradiation; this proved to diminish the radiation effect. Or, better still, we irradiated the solutions without the cells, then added catalase to the irradiated solutions, and then added the cells. We found that the irradiated solutions lowered the fermentation of cancer cells almost like irradiation; after the addition of catalase, however, the irradiated solutions no longer affected the fermentation of cancer cells.

Studies of this kind, which were extended to the formation of methemoglobin by x-rays showed that it is essentially the hydrogen peroxide formed that inhibits the fermentation of dilute suspensions of cancer cells during irradiation, rather than the H atoms and OH radicals, which, according to JOSEPH WEISS, are the primary degradation products of water. Thus, the reactions in which hydrogen peroxide is formed during irradiation

$$2\,OH = H_2O_2$$
$$2\,H + O_2 = H_2O_2$$

obviously proceed more rapidly under our experimental conditions than do reactions of H and OH with fermentation enzymes (*60*, *63*, *64*, *65*, *66*, *82*).

XI. Photosynthesis*

1. Experimental material

We no longer use continuous light to cultivate Chlorella for yield determinations; since 1956, we have used fluctuating light, whose light-dark time intervals correspond to the day, night, and twilight periods. This, above all, but also other measures are responsible for the fact that good quantum yields are now reproducible any time at will, and explains failures in earlier times.

---

* *1961 Addition.* In 1960 "Problems in Photosynthesis" by W. BLADERGROEN was published in the American Lecture Series (Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill.). This is the first constructive presentation of this field of investigations that has appeared in many decades. It does not detail theories but describes experiments and techniques.

2. Blue-green light

In 1955 we discovered that blue-green light acts as a catalyst in photosynthesis. Other very pure spectral regions of visible light are either ineffective or only of very poor effectiveness in photosynthesis, unless small amounts of blue-green light are added. Since that time, blue-green light has always been added in measurements of the quantum requirement.

The action spectrum of blue-green light yielded a peak at approximately 458 mμ and is probably the absorption spectrum of an enzyme. The determination of this action spectrum is one of the more difficult tasks of radiation-physics, since it requires that each of two light beams of different color is split into two parts; also that four beams are bolometrically adjusted for each point of the action spectrum. These operations can be carried out only in a well equipped radiation laboratory.

*3. Quantum Requirement of Photosynthesis in Chlorella**

When the quantum requirement of photosynthesis was newly determined in 1960, the progress in cell cultivation, radiation and absorption measurement, and manometry were taken into consideration as well as the necessity of adding blue-green light of low intensities. Experiments can now last as long as desired and produce manometric changes (almost exclusively in the region of positive pressure) of any desired magnitude. In addition, one has the choice of the two-vessel method—provided the equipment necessary for splitting the light beams is available—or a very simple one-vessel method, in which the carbon dioxide pressure is kept constant by carbonate mixtures separated from the cells.

The following are examples of determinations we made by means of the new one-vessel method, when the incident light was red and the respiration was compensated for with blue-green light (see page 582):

CO_2 Pressure (mm Brodie)	$\left[\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Quanta}}{O_2}\right]$
8	21
31	6.9
75	3.6
140	2.83
202	2.75

These figures show how remarkably the quantum requirement changes with the carbon dioxide pressure and that the limiting value of the quantum requirement is reached only when the carbon dioxide pressure exceeds 200 mm Brodie. The limiting value is

$$\frac{1}{\varphi} = 2.75 \left[\frac{\text{Quanta}}{O_2}\right]$$

* Addition in September 1961. In the meantime it has been confirmed that the quantum requirement of leaves is much greater, namely 15 to 20 per molecule of oxygen (page 542). If the mechanism of photosynthesis in leaves is the same as in Chlorella, it follows that in leaves a much greater fraction of the produced oxygen reacts back.

This is very close to the thermodynamically possible minimum value when the molar energy required to split carbon dioxide is 112,000 cal. It is also close to the minimum value that we find with the two-vessel method; this may appear obvious but is mentioned here because of inexpert criticism of the two-vessel method.

Since the same number of light quanta absorbed by chlorophyll develop the same amount of oxygen over the entire visible spectral region, we can calculate the energy transformation in visible light as follows, when we assume that the molar energy required to split carbon dioxide is 112,000 cal.:

Wavelength of light ($m\mu$)	Energy transformation $\left[\frac{\text{Gain in chemical energy}}{\text{Absorbed light energy}}\right]$
436	$\frac{112{,}000}{2.75 \times 65{,}000} \times 100 = 62\%$
546	$\frac{112{,}000}{2.75 \times 52{,}000} \times 100 = 78\%$
680	$\frac{112{,}000}{2.75 \times 42{,}000} \times 100 = 96\%$

The fact that the quantum yield at a carbon dioxide pressure of 20 mm Brodie represents only a small part of the maximum quantum yield is of historical interest. 20 mm Brodie has been the pressure of carbon dioxide at which EMERSON determined the quantum requirement of photosynthesis 20 years ago and at which he found a quantum requirement of 10 to 20 per molecule of oxygen. EMERSON added the totally unfounded claim that the yield obtained at 20 mm Brodie was the highest possible yield, in spite of the fact that according to our prescriptions Chlorella had been cultivated at a carbon dioxide pressure of 500 mm Brodie.

Probably no one would have taken EMERSON's claim seriously, if FRANCK and GAFFRON[18] had not produced a "thermodynamic theory" to show that the yield EMERSON obtained at 20 mm Brodie was indeed the highest that could be achieved.

In 1949 in Bethesda (U.S.A.), with DEAN BURK and several other American colleagues, we used the newly developed respiration-compensation technique to determine the quantum yield at a carbon dioxide pressure of 500 mm Brodie. In a long series of experiments a quantum requirement of less than 4 was found; this result agreed with the earlier work done at Dahlem.

FRANCK and GAFFRON, supported by EUGENE RABINOWITSCH, stuck nevertheless to their thermodynamics. And without themselves contributing any experimental work to the energetics of photosynthesis, they have been making propaganda for EMERSON's claims for 20 years.

4. 1-Quantum Reaction

If we summarize the results of our yield determinations by means of the equation

$$H_2CO_3 + 2.75\,h\nu = CH_2O + O_2$$

it is evident that this equation does not represent a single chemical reaction but expresses the balance of several reactions. For multiquanta reactions are unknown in photochemistry and no photochemical process, biological or nonbiological, can

be considered explained, until the 1-quantum reaction on which it is based has been discovered.

Working in Dahlem, in 1950, DEAN BURK and the author discovered the 1-quantum reaction of photosynthesis, a reaction in which 1 light quantum develops 1 molecule of oxygen, as follows:

$$XO_2 + 1\,h\nu = X + O_2$$

where XO_2 is the substance from which the oxygen develops. Obviously, XO_2 cannot be carbon dioxide, since several quanta of visible light are needed to liberate the oxygen from carbon dioxide.

This is the way the 1-quantum reaction was discovered. We were making yield determinations with Chlorella and were calculating the yields, as usual, from the difference in manometric readings obtained in light and in darkness. During this work we noticed that yields improved when the intervals between the light and dark periods were shortened. A limit was reached at time intervals of 1 minute each. Then 1 light quantum developed 1 molecule of oxygen.

In the course of these experiments we further observed that shorter light and dark periods not only increased the amount of oxygen developed in light but also the oxygen consumed in the dark. To the discovery of the 1 quantum reaction in light was thus added the second discovery that the subtrate XO_2 arises in a dark reaction in which extra oxygen is consumed. This discovery led to an explanation of the 1-quantum reaction energetically and chemically.

Many favorable conditions contributed to these discoveries; but a high carbon dioxide pressure (at least 10% of an atmosphere) was primarily responsible.* If the carbon dioxide pressure had failed to exceed 2% of an atmosphere, the 1-quantum reaction would not have been discovered. Another condition promoting these discoveries was the substitution of ammonium chloride for nitrate in the suspension medium of Chlorella; the use of large quantities of cells in the manometric vessels was necessary because the 1-quantum reaction is not a catalytic but a stoichiometric cell reaction; and, finally, a fully developed two-vessel method was required that would suffice to measure the oxygen metabolism in one minute with an adequate degree of accuracy. As in other areas of cell physiology, the decisive discoveries were made by the use of the two-vessel method.

Later on the techniques for measuring the 1-quantum reaction were simplified and improved. In the course of years, use of the new methods brought confirmation of all results of the first work, experiments as well as conclusions.

5. Is Water the Photolyte in Photosynthesis?

The theory that photosynthesis is the photolysis of water originated by the use of isotopes in experiments with Chlorella, in which the oxygen of the water was

---

* *1961 Addition.* High carbon dioxide pressures are necessary to saturate Chlorella with photolyte: that means to saturate the chlorophyll with photolyte. Only from chlorophyll that is combined with photolyte can absorbed light develop oxygen.

labeled but the oxygen of the carbon dioxide was not. It was observed that a part of the oxygen given off in light was tracer-labeled. In view of the rapid hydration of carbon dioxide in Chlorella, however, these experiments in no way constitute proof for the photolysis of water.

Subsequently, R. HILL thought he had proved the photolysis of water, when he discovered that ferric oxalate develops oxygen in light from chloroplasts, *without addition of carbon dioxide*. HILL's experiments, however, failed to prove the photolysis of water, since ferric oxalate produces carbon dioxide in light and since, in other ways as well, carbon dioxide was not properly excluded from the experiments.

It is a fact that for a long time, from 1944 to 1958, the only support for the theory of water photolysis could be found in our studies[19]. This work showed that quinone develops oxygen from green grana carefully washed with water, the reaction taking place in the presence of light and according to the equation

$$2 \text{ quinone} + 2\ H_2O = 2 \text{ hydroquinone} + O_2$$

The inability of the grana to develop oxygen from added carbon dioxide seemed to block the oxygen-from-carbon dioxide pathway even more effectively.

In 1959 and 1960, however, application of new methods to the quinone reactions made us realize that such reactions could not proceed without carbon dioxide. Only a very small quantity of carbon dioxide was needed, because the effect of carbon dioxide in these quinone reactions is catalytic rather than stoichiometric. Actually the only difference between quinone reactions and photosynthesis is with respect to the mechanism by which carbon dioxide is utilized: In quinone reactions, the reduced carbon dioxide is completely reoxidized to carbon dioxide by excess quinone; whereas, in photosynthesis, a part of the reduced carbon dioxide remains in the form of "fixed carbon dioxide." Thus, in 1960, went down the only supporting pillar of the theory of water photolysis, and with it, the entire edifice of theories based on the photolysis of water.

We never took it seriously that the reduction of phosphoglyceric acid by dihydronicotinamide—a reaction we discovered (see page 30) in 1939—should be the reaction by which carbon dioxide is reduced in photosynthesis. The appearance of phosphoglyceric acid in radiograms taken from Chlorella after exposure to light is adequately explained by the occurrence of light-induced respiration.

6. The real Photolyte of Photosynthesis

If Chlorella is shaken with carbon dioxide, under aerobic conditions and in the dark, carbon dioxide is fixed chemically. If the uptake of carbon dioxide is allowed to proceed to completion and is then followed by illumination, the carbon dioxide disappears, with evolution of oxygen. This latter reaction proceeds until there is equilibration of the processes of degradation and uptake of carbon dioxide, that is until photosynthesis has reached a steady state. We call the carbon dioxide compound accumulating in the dark, from which oxygen is liberated in light, the photolyte of photosynthesis.

The maximum concentration of photolyte that can be obtained in Chlorella depends on the pressure of carbon dioxide and on the type of cells that are being

cultivated. In the A cells, which give the best quantum yields in light, saturation with photolyte is reached when the carbon dioxide pressure equals 10 to 20% of an atmosphere; the concentration of photolyte then usually equals the concentration of chlorophyll.

The photolyte arises only under aerobic conditions, when the cells are respiring; it decomposes, giving off carbon dioxide, when the cells are deprived of oxygen.

The formation of the photolyte is inhibited when the cells are suspended in arsenate instead of phosphate, but the amount of photolyte formed reverts to its normal value when phosphate is added to the arsenate solution.

The photolyte content is closely related to the glutamic acid content. If glutamic acid in living Chlorella is permitted to decompose into γ-aminobutyric acid and carbon dioxide, the photolyte will also decompose and thereby give off carbon dioxide; if glutamic acid is resynthesized in living Chlorella, the photolyte is formed once more. In A cells, which give the best quantum yields, the photolyte concentration is usually found to equal the glutamic acid concentration.

All the above-mentioned reactions of the formation and degradation of the photolyte are very rapid; they are partial reactions of the mechanism of photosynthesis and have nothing in common with the slow reactions of protein synthesis, transaminations, etc. For example, the half-life period of the formation of photolyte during a change from anaerobic to aerobic conditions is 5 minutes at 20°C.

The first reaction in the formation of photolyte may be the reversible phosphorylation of carbon dioxide by ATP (adenosine triphosphate)

$$H_2CO_3 + ATP \rightleftharpoons HCO_3H_2PO_3 + ADP$$

a reaction that explains the dependence on carbon dioxide pressure and on respiration. The carboxy-phosphate formed then enters into a reversible reaction with glutamic acid, the resulting glutamic acid compound reacts reversibly with chlorophyll. (cf. Seite 567 und 627)

7. *Light-induced respiration of grana*

The following properties of grana are here discussed:

1. Grana from leaves or from chlorella have no dark respiration.
2. Grana although they develop oxygen in light cannot fix carbon.
3. Oxygen development by grana in light is not inhibited by hydrocyanic acid.

It may be added that respiration in chlorella can easily be destroyed, for instance by very small amounts of quinone, and that chlorella by such treatment acquires the properties of grana inasmuch that it can no more fix carbon and that oxygen development in light is no more inhibited by hydrocyanic acid.

It has been one of the main problems of the grana reactions how it is possible energetically, that grana develop oxygen from carbon dioxide, although they have no respiration at their disposal, the energy of which could transform carbon dioxide into the photolyte. The answer is that grana have no dark respiration but that they have light-induced respiration.

Let a quinone be the catalyst, then the equations of light-induced respiration are:

$$2 \text{ quinone} + 2\,H_2O + C = 2 \text{ hydroquinone} + CO_2 \quad [1]$$
$$O_2 + 2 \text{ hydroquinone} = 2 \text{ quinone} + 2\,H_2O \quad [2]$$

balance	$C + O_2 = CO_2$	[3]
light	$CO_2 = C + O_2$	[4]
balance	$0 = 0$	[5]

But if the balance of light-induced respiration is zero, how can light-induced respiration be discovered? In the dark it cannot be discovered, because in the dark it does not occur. In light it cannot be discovered, because in light the produced carbon dioxide is split according to equation [4] into $C + O_2$.

Yet it has been possible to discover and to measure light-induced respiration. If to a suspension of illuminated grana as much hydrocyanic acid is added that the catalase of the grana is inhibited, then in reaction [2] the double amount of oxygen is consumed:

$$2\,O_2 + 2 \text{ hydroquinone} = 2 \text{ quinone} + 2\,H_2O_2$$

and two molecules of hydroperoxide are formed for each molecule of oxygen developed. Then the balance of the equations [1] to [5] is no more zero but becomes:

$$O_2 + 2\,H_2O = 2\,H_2O_2$$

This means that light-induced respiration can be measured by the consumption of oxygen and by the production of the double amount of hydrogen peroxide; a method that has been possible owing to the fact that oxygen development in illuminated grana is not inhibited by hydrocyanic acid. In this way light-induced respiration of the grana has been discovered and the energy problem of the grana reactions has been solved.

Light-induced respiration may also explain in a simple way why grana cannot fix carbon. Let us assume that in illuminated grana the oxidation of reduced carbon dioxide proceed quickly in comparison to the reduction of carbon dioxide and that, inversely, in illuminated cells, reduction proceed quickly in comparison to oxidation, then we may understand why darkening produces in cells, but not in grana, a gain of reduced carbon dioxide, that is, fixation of carbon.

The third point—that oxygen development in illuminated grana is not inhibited by hydrocyanic acid—is still mysterious. We have no idea how to explain the different behavior of cells and of grana toward hydrocyanic acid.

Literatur

1 Warburg, O., Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie 154 (1913), 599, 158 (1914), 19.
2 Warburg, O., Christian, W., und Griese, A., Bioch. Zschr. 282 (1935), 157, sowie Negelein, E., Haas, E., Bioch. Zeitschr. 282 (1935), 206.
3 Chorine Vital, Compt. Rend. Acad. des Sciences, 150, 220, Paris 1945.
4 Lummer, O., und Pringsheim, E., Verh. Deutsche Phys. Ges. 2 (1900), 163, 176.
5 Planck, M., ebenda 2 (1900), 202, 237.
6 Warburg, E., Sitz. Ber. Berl. Akad. 1911, Seite 249; 1914, Seite 881; 1916, Seite 314; 1918, Seite 881; usw. bis 1930.
7 Warburg, O., Ergebnisse der Enzymforschung 7 (1938), 210; Die Umschau, Heft 2, 1938.
8 Lipmann, F., J. Biol. Chem. 160 (1945) 173.
9 Lynen, F., Reichert, E., und Rueff, L., Liebigs Ann. 574 (1951), 1.
10 Stern, I. R., Ochoa, S., und Lynen, F., J. Biol. Chem. 198 (1952), 313.
11 Krebs, H. A., Les Prix Nobel, 1953, 139.
12 MacDonald, S. F., J. Am. Chem. Soc. 82 (1960), 3183.
13 Martius, C., und Mitarbeiter, Bioch. Zschr. 326 (1954) 26; 327 (1955), 1; 329 (1957), 450.
14 Harden, Arthur, Uppsala, 1938 (Almqvist und Wiksells).
15 Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Zschr. 303 (1939), 40.
16 Wind, F., Bioch. Zschr. 159 (1925), 58.
17 Needham, D., Biochem. J. 49 (1951), 113.
18 Franck, J., und Gaffron, H., Advances in Enzymology 1 (1941), 199. "We know now that the high quantum efficiency is only apparent and that the true efficiency is probably only a third of it, namely 12 quanta per CO_2 molecule reduced."
19 Warburg, O., und Lüttgens, W., Die Naturwissenschaften, April und Oktober 1944, sowie Warburg, O., Heavy Metals and Enzyme Action. Oxford, Clarendon Press, 1949.

Otto Heinrich Warburg

(1958)

DEAN BURK

Head Biochemist, National Cancer Institute, Bethesda (Maryland)
Seit 1950 auswärtiges Mitglied des Kaiser-Wilhelm-Instituts
für Zellphysiologie in Berlin-Dahlem.
Entdeckte im Jahre 1950 im Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie
die 1-Quantenreaktion der Photosynthese

(DEAN BURK und WARBURG, O., Die Naturwissenschaften 37 [1950], 560)

1 Otto Warburg, artisan of cell chemistry*

By Dean Burk

Otto Heinrich Warburg was born on October 8, 1883 in Freiburg in Baden. In 1896 he came with his parents to Berlin, where his father, Emil Warburg, had been called to the Chair of Physics in the University of Berlin and was later from 1905 to 1922 President of the *Physikalische Reichsanstalt* (Imperial Bureau of Physical Standards). The mother of Otto Warburg stemmed from a family of public officials and soldiers, her brother fell as a general in World War I. In two large official residences of his parents—the first at the Marschallbrücke in Berlin, the second in Marchstrasse in Berlin-Charlottenburg, and both built from plans prepared by Frau von Helmholtz—Otto Warburg grew up during the culminating period of the Germany of Wilhelm II.

In the home of his parents, Theodor Wilhelm Engelmann told him about *Bacterium photometricum* and photosynthesis; Emil Fischer about plans to fathom the secret of enzymes; and Jakobus Hendricus Van't Hoff about the maximum work obtainable in chemical reactions. Thus the course of his life was already set in childhood.

Later, at the university, he learned chemistry from Emil Fischer, with whom he worked for three years; medicine in the clinic of Ludolf von Krehl, to whom he was an assistant for three years; thermodynamics from Walter Nernst, with whom he worked on oxidation-reduction potentials in living systems in 1914; and physics and photochemistry from his father, with whom he worked on the quantum requirement of photosynthesis in 1920 in the *Physikalische Reichsanstalt*. In 1913 he became a Member of the newly founded Kaiser Wilhelm Society. Since then, without interruption except for World War I, he has contributed increasingly to the fame and renown of this scientific organization, from 1931 on as Director of the Institute whose name is known to all biochemists.

He has never given a course of lectures to students. He is no administrator. He is no member of committees. Among the forty rooms in his institute he has no office, conference room, or writing room, apart from the general library. He selects his staff on a basis of technical ability. In his opinion, the building of a research institute in the natural sciences must have for its main foundation a permanent staff of technically trained assistants.

He is best characterized as an artisan, or even, by his own frequent say so in public, as a technician. He believes that, in the natural sciences, one can find out something new when one does something with one's hands that nobody did before. Thus, the fermentation of tumors was discovered when in the surrounding Ringer-solution the bicarbonate concentration was raised 20-fold. Iron-oxygenase was discovered when in biological experimentation with carbon monoxide the CO-pressure was raised 1000-fold. Acyl phosphate was discovered when in the oxi-

---

* Aus Biochimica et Biophysica Acta 12 (1953): 9.

dation-reaction of fermentation the phosphate concentration was raised 20-fold The energy cycle and one-quantum reaction of photosynthesis was discovered when the light-dark time intervals measured in manometry were shortened from 5 minutes to 1 minute. Or, to mention an earlier classic example: the discovery of PLANCK's energy quanta was initiated when in 1899 LUMMER and PRINGSHEIM placed KURLBAUM's bolometer before a black body heated to different temperatures.

Although OTTO WARBURG endeavors to advance science mainly through his own experimental works, it cannot be said that he fails to look out for the future of scientists. Thus, he very early recognized the native gifts of RICHARD KUHN and ADOLF BUTENANDT, and assisted notably in their obtaining research institutes of the Kaiser Wilhelm Society at relatively youthful ages; he is at present similarly concerned for younger colleagues. For all positions obtained by OTTO MEYERHOF in Germany—in Kiel, in Berlin, and in Heidelberg—he labored, successfully, against widespread opposition. After 1933, he helped scores of political refugees to leave Germany and to obtain haven and positions elsewhere.

But, like the Cowardly Lion of Oz, he was no "resistance-fighter": he was not prepared to die as a defenceless scientist in combat with political dictators. Yet he has been ever ready to lose his life as a soldier in the army. In World War I, as an officer in the Prussian Horse Guards on the Russian front, he rode in many field patrols in advance of the infantry, and was eventually wounded in action. In the early years of this fighting, he was, by the by, armed with both pistol and—less effective but more sinister—mediaeval lance!

He has spent the greater part of his life in Berlin, the most restless city in a restless world. Here he was ever favored with luck. In World War II, during the years 1939 to 1945, he and his entire staff enjoyed the singular privilege of continuing to work on purely scientific problems without reference to war work. In 1943, as Berlin became dangerous because of air attacks, Prince von Eulenberg placed at his disposal the nearby castle of Liebenberg, where he and his staff lived and worked, with transported equipment, undisturbed until 1945. In that year the Red Army took possession of the Island of Rügen in the Baltic, and immediately provided a military guard for his estate there, making it possible for him to continue his studies still undisturbed.

His only misfortune was that in June 1945 the Russians removed all the equipment from his institutes. It appears that this took place at the instigation of the local Dahlem communists, for shortly thereafter Marshal Zhukov, Commander-in-Chief of the Russian-occupied zone, invited WARBURG for a visit to tell him, in the name of the Russian government, that the dismantling of his institutes had been a mistake, and a misfortune for science. The Marshal issued an order that the apparatus and books be returned, but alas, everything had already been scattered to the four winds.

After the Yalta-Teheran agreement it became doubtful whether WARBURG belonged to the Russian or to the American occupation zone, since he was domiciled partly in the Russian zone, on the Island of Rügen, and partly in the American sector of west Berlin; and, furthermore, his Liebenberg institute lay in the Russian

zone, while the mother research institute was in the American sector of Berlin. WARBURG decided for the Americans, and in 1948 began anew to re-establish at Dahlem the Kaiser Wilhelm Institute* for Cell Physiology, the building of which had remained undamaged. From all sides he received help, as reward for not fleeing from Berlin, from neither Hitler nor Stalin. His efforts during the war years and after, to maintain his laboratory and experimental work, bore fruit in the uniquely early reconstitution of his institute, which, already in 1949, had become well equipped with apparatus and books.

It was during this year of the re-equipment of his Dahlem institute that he availed himself of an opportunity to visit his American friends. Through the courtesy and generous support of the National Institutes of Health, United States Public Health Service, at Bethesda, Maryland, he was enabled, in cooperation with the staff of the Cytochemistry Section there, and with STERLING HENDRICKS of the United States Department of Agriculture at nearby Beltsville, to develop modern methods of photosynthetic experimentation, and to "rediscover" the high efficiency of photosynthesis. As a conclusion to this important and memorable visit, the experimental set-up at Bethesda was transferred for the summer of 1949 to the Marine Biological Laboratory at Woods Hole, Massachusetts, where he had the privilege of demonstrating for many weeks, through the hospitality of Professor E. S. GUZMAN-BARRON, the new methods to the rising generation of American biologists. Since these Woods Hole days he has been a member of the Institute for Muscle Research founded by ALBERT SZENT-GYÖRGYI and STEPHEN RATH.

On May 8, 1950, General MAXWELL D. TAYLOR**, then Military Commandant of the American Sector of Berlin, officially reopened the Dahlem institute. The rebirth of the Kaiser Wilhelm Institute for Cell Physiology, celebrated with ceremony on that day, the fifth anniversary of the cessation of hostilities, was a signal event both for science and for the promotion of good relations among men of good will everywhere. Today, the Institute stands at the crest of the biochemical institutes of the world, and, in addition, is probably the finest photochemical institute in existence. Its director expects to do his greatest and boldest experiments, as did his distinguished father before him, after passing the three score and ten mark. His genius may be likened to a positive first order reaction with an extended half-time, attained only after the Half-Century of Biochemical Discovery listed below.

It would be superfluous here to give an extended list of the many honors received by Professor WARBURG, such as the Nobel Prize in Medicine (1931, for iron-oxygenase), Foreign Membership in the Royal Society of London (1934), and, most recently (1952), Knighthood in the Order of Merit founded originally by Frederick the Great and restricted to thirty of Germany's most distinguished citizens.

A scientific appreciation of his work is probably best realized by the following appended table, which contains a list of experimental contributions regarded by him as his most important discoveries. Most of these were accomplished and accep-

* Since July 1953: Max Planck Institute.

** Heute militärischer Chefberater des Präsidenten der USA John F. Kennedy.

ted only after long struggle, but this was no disadvantage. For the greater the resistance to a discovery, the more is the discoverer forced to fortify the new domain of knowledge; and the greater is the final victory. At the moment, battle rages over the energetics of photosynthesis. But the termination of this battle can no longer be in doubt when one reads the two communications concluding this volume. Indeed Time, the sovereign judge, has shown that all his published experiments have been right. Most of them were ahead of their time. Thus, their significance is still increasing.

2 Über die Kristallisation von Gärungsfermenten und ihre optischen Teste*

Von Otto Warburg

Versucht man, unsre heutigen Kenntnisse über den Mechanismus der Gärung in wenigen Worten zusammenzufassen, so könnte man etwa sagen, daß Hexose im phosphorylierten Zustand zu Triosephosphat gespalten wird; daß Triosephosphat, nach Aufnahme eines zweiten Moleküls Phosphorsäure, zur Stufe der Brenztraubensäure oxydiert wird; und daß die Brenztraubensäure im dephosporylierten Zustand zu Milchsäure reduziert wird.

Mindestens 11 Fermente wirken dabei zusammen, in Reaktionen, die alle reversibel und deren Gleichgewichte gut meßbar sind. In der folgenden Liste der Fermente der Milchsäuregärung ist die Richtung von links nach rechts die Richtung, in der die Fermentreaktionen bei der Gärung ablaufen und nach der die Gärungsfermente zu benennen sind. Man darf also zum Beispiel das reduzierende Gärungsferment nicht „Milchsäuredehydrase" nennen**; die Enolase nicht „Desenolase" und die dephosphorylierenden nicht „phosphorylierende" Gärungsfermente; obwohl man, da die Gärungsreaktionen umkehrbar sind, aus chemischen Gründen dazu berechtigt wäre.

Liste der Fermente der Milchsäuregärung

1. Zymohexase

1 Hexosediphosphat $\rightleftarrows$ 1 Aldotriosephosphat + 1 Ketotriosephosphat.

2. Isomerase

Ketotriosephosphat $\rightleftarrows$ Aldotriosephosphat.

---

* Aus O. Warburg, Wasserstoffübertragende Fermente, W. Saenger, Berlin. 1948 (vergriffen)

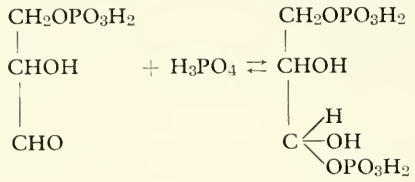
** *Zusatz 1961.* Mit dem Namen Alkoholdehydrase wird heute in der biochemischen Literatur dasjenige Gärungsferment bezeichnet, das bei der alkoholischen Gärung den Alkohol *nicht* dehydriert, sondern den Alkohol erzeugt in einem Maßstab, der alle anderen Umsätze der angewandten Biochemie übertrifft. Die Absicht bei dieser Umkehr der Nomenklatur war offenbar der Wunsch, das Neue auf etwas Altbekanntes zurückzuführen. Nun ist zwar wahr, daß vor der Entdeckung der reduzierenden Gärungsreaktion in Zellextrakten eine biologische Dehydrierung des Alkohols mehrfach beobachtet worden ist, aber niemand hatte vor der Entdeckung des Nikotinsäureamids als Wirkungsgruppe der wasserstoffübertragenden Fermente eine Ahnung davon,

1. daß der Alkohol bei der alkoholischen Gärung durch eine Reaktion des Aldehyds mit hydriertem Nikotinsäureamid entsteht,
2. daß die biologische Dehydrierung des Alkohols die Umkehr der reduzierenden Gärungsreaktion ist.

Man hat also keinen sachlichen Grund, die reduzierenden Gärungsfermente Dehydrasen zu nennen und damit ihre Funktion als Gärungsfermente zu verschleiern.

2a. Phosphorylierung des Aldotriosephosphats, die wahrscheinlich keine Fermentreaktion ist:

3-Phosphoglycerinaldehyd + H_3PO_4 ⇄ 1,3-Phosphoglycerinaldelyd.



3. Oxydierendes Gärungsferment

a) reversibel:

1,3-Phosphoglycerinaldehyd + Pyridinnukleotid ⇄ 1,3-Phosphoglycerinsäure + Dihydropyridinnukleotid.

b) irreversibel, bei Gegenwart von Arseniat:

Phosphoglycerinaldehyd + Pyridinnukleotid + H_2O = 3-Phosphoglycerinsäure + Dihydropyridinnukleotid.

4. Erstes dephosphorylierendes Ferment

1,3-Phosphoglycerinsäure + Adenosindiphosphat ⇄ 3-Phosphoglycerinsäure + Adenosintriphosphat.

5. Mutase

3-Phosphoglycerinsäure ⇄ 2-Phosphoglycerinsäure.

6. Enolase

2-Phosphoglycerinsäure ⇄ Phosphobrenztraubensäure + H_2O.

7. Zweites dephosphorylierendes Ferment

Phosphobrenztraubensäure + Adenosindiphosphat ⇄ Brenztraubensäure + Adenosintriphosphat.

8. Reduzierendes Gärungsferment

Brenztraubensäure + Dihydropyridinnukleotid ⇄ Milchsäure + Pyridinnukleotid.

9. Adenosintriphosphatase

Adenosintriphosphat + H_2O ⇄ Adenosindiphosphat + H_3PO_4.

10. Erstes phosphorylierendes Ferment

Adenosintriphosphat + Hexose ⇄ Adenosindiphosphat + Hexosemonophosphat

11. Zweites phosphorylierendes Ferment

Adenosintriphosphat + Hexosemonophosphat ⇄ Adenosindiphosphat + Hexosediphosphat

Weitere Gärungsfermente

Wahrscheinlich sind zwischen (10) und (11) noch 2 Fermente einzuschalten, eine Mutase, die Glukose-1-Phosphat (Coriester) in Glukose-6-Phosphat verwandelt; und eine Isomerase, die Glukose-6-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat umlagert. Im Fall der alkoholischen Gärung ist hinter (7) die Carboxylase einzuschalten:

Brenztraubensäure = Acetaldehyd + Kohlensäure

und weiterhin Gleichung (8) zu ersetzen durch:

Acetaldehyd + Dihydropyridinnukleotid ⇄ Aethylalkohol + Pyridinnukleotid.

Von den 11 Fermenten der Milchsäuregärung sind das oxydierende und das reduzierende Ferment und ihre prosthetischen Gruppen zuletzt entdeckt worden, nämlich erst in den Jahren 1935 bis 1939. Vorher war es nicht möglich, den Mechanismus der Gärung zu verstehen: wie das Triosephosphat zur Oxydationsstufe der Brenztraubensäure oxydiert wird und wie die Brenztraubensäure zu

Milchsäure reduziert wird. Die bis 1935 aufgestellten Gärungstheorien gingen mit Dismutationsgleichungen, die nur Bilanzgleichungen waren, über das Unbekannte hinweg.

Viel früher, nämlich schon in den Jahren 1905 bis 1911, entdeckten HARDEN und YOUNG die phosphorylierenden und die dephosphorylierenden Gärungsfermente. Es folgten nach einem langen Stillstand, an dem das Methylglyoxal nicht unschuldig war, NEUBERG, MEYERHOF, LOHMANN und KIESSLING mit der Entdeckung der Carboxylase, Zymohexase, Isomerase, Mutase und Enolase. Weder Harden noch Meyerhof isolierten oder trennten Fermente. Um so mehr muß man den Scharfsinn bewundern, dem es gelang, ohne zu trennen soviel zu entwirren.

Das folgende soll keine zusammenfassende Darstellung der Gärung sein, sondern lediglich ein Bericht über neuere eigene Arbeiten.

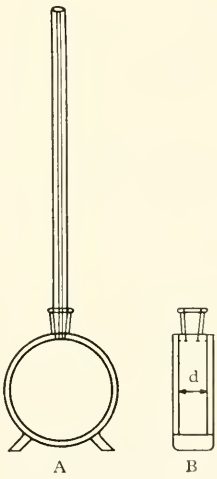
Ich werde mit den optischen Testen beginnen, einem neuen technischen Hilfsmittel, dem die Zukunft auf dem Gebiet der Gärungen gehört*. Verfolgt mit einem optischen Test, ist bisher noch kein Gärungsferment seiner Isolierung entgangen.

Ich werde dann die Isolierung und Kristallisation von Gärungsfermenten beschreiben und in jedem Fall hinzufügen, was sich durch die Isolierung an neuen Erkenntnissen und Problemen ergeben hat.

Ein Gärungsferment, mit dem ich mich noch nicht beschäftigt habe, ist die Adenosintriphosphatase, die nach Arbeiten W. A. ENGELHARDT[1] und A. v. SZENT-GYÖRGYI das wichtigste aller Gärungsfermente ist; soll es doch nichts anderes sein als das Muskel-Myosin und soll es durch die chemische Reaktion, die es bewirkt, der Energietransformator sein, der die chemische Energie der Milchsäuregärung in Arbeit verwandelt.

I. Prinzip der optischen Teste

Da bei der Oxydationsreaktion und bei der Reduktionsreaktion der Gärung Dihydro-Pyridinnukleotid[2] entsteht oder verschwindet; und da Dihydro-Pyridinnukleotid im ultraviolett um 340 mμ eine starke Bande hat, so kann man die beiden Gärungsreaktionen mit optischen Methoden nachweisen und messen. Aber auch die andern Gärungsreaktionen kann man durch das Entstehen oder Verschwinden der Dihydro-Pyridinbanden messen, da alle Gärungsreaktionen als Glieder einer reversiblen Reaktionskette in ihrem Verlauf voneinander abhängen.



Figur 1. Absorptionstrog aus Quarz.
A: Vorderansicht.
B: Seitenansicht.
d: Schichtdicke.

Eine zweite Absorptionsbande, die bei der Gärung entsteht und verschwindet, ist die Enolbande der Phosphobrenztraubensäure[3]. In dem aufsteigenden Ast dieser Bande ist bei 240 mμ die Lichtabsorption so stark, daß man bei

* *Zusatz 1961.* Diese Voraussage hat sich mehr als erfüllt. Statt Zukunft auf dem Gebiet der Gärungen hätte es „Zukunft auf dem Gebiet der Biochemie" heißen müssen.

240 mμ Gärungsreaktionen, bei denen Phosphobrenztraubensäure entsteht oder verschwindet, optisch messen kann.

Zur Ausführung der optischen Teste benutzen wir Quarztröge von 3 cm^3 Inhalt, deren planparallele Wände einen Abstand von 0,5 cm haben (Figur 1). Die Apparatur besteht aus Wasserstoffrohr als Lichtquelle, Monochromator, Kalizelle mit Argonfüllung und Fadenelektrometer oder bequemer, aber weniger vielseitig anwendbar: aus Quecksilberlampe, Monochromator, Sperrschichtzelle und Multiflexgalvanometer nach B. LANGE.

Wegen der Stärke der Banden braucht man für einen optischen Test nur wenig Substanz, von Pyridinnukleotid etwa 1 Mikromol und von Phosphobrenztraubensäure etwa 3 Mikromole; und wegen der Genauigkeit der lichtelektrischen Meßmethoden genügt es im allgemeinen, die Lichtschwächungen in 2 aufeinanderfolgenden Minuten abzulesen. Die Änderung des Logarithmus der Lichtschwächung pro Minute, dividiert durch die Konzentration des Fermentproteins F, war dann die relative Wirksamkeit W des Fermentproteins

$$W = \frac{\Delta \ln \frac{i_0}{i}}{\Delta t} \cdot \frac{1}{F}.$$

Weitere Rechnungen waren nicht nötig, wenn der Test dazu dienen sollte, ein Isolierungsverfahren für ein Ferment auszuarbeiten.

Wenn aber für andere Zwecke aus den Lichtschwächungen die Konzentrationen der lichtabsorbierenden Substanzen berechnet werden sollten, so wurden die folgenden molaren Lichtabsorptionskoefficienten

β_{340} des Dihydropyridinnukleotids : $1{,}39 \cdot 10^7 \frac{cm^2}{Mole}$ *

β_{240} der Phosphobrenztraubensäure (bei pH 7,4) : $4{,}0 \cdot 10^3 \frac{cm^2}{Mole}$

in die Gleichung $\frac{i_0}{i} = e^{\beta \cdot c \cdot d}$

eingesetzt, in der c die Konzentration der lichtabsorbierenden Substanz in $\frac{Mole}{cm^3}$ bedeutet und d die Schichtdecke der Lösung in cm, die i_0 auf i schwächt.

Gemäß dieser Gleichung ist die Konzentration c der lichtabsorbierenden Substanz

$$c = \frac{1}{\beta \cdot d} \cdot \ln \frac{i_0}{i}$$

II. Kinetik

Wenn es auch für die Anwendung der Teste nicht notwendig war, so hat es sich doch bei der Ausarbeitung der Teste ergeben, daß die Kinetik der Fermentreaktionen untersucht wurde. Die Ergebnisse sind wegen ihrer Einfachheit interessant.

Wir gehen dabei von zwei vereinfachenden Bedingungen aus: daß die Fermentproteine mit den Reaktionsteilnehmern — den prosthetischen Gruppen und den Substraten — gesättigt sind; und daß die verschwindenden und die entstehenden Stoffe gleich fest von den Fermentproteinen gebunden werden. Die erste Be-

* *Zusatz 1961.* Wir rechnen heute mit $\beta_{340} = 1{,}42 \cdot 10^7 \frac{cm^2}{Mole} = 14{,}2 \left[\frac{cm^2}{\mu Mole}\right]$.

dingung ist, da die Bindungen fest sind, durch geeignete Wahl der Konzentrationen immer leicht zu erfüllen. Auf die zweite Bedingung hat man keinen Einfluß. Merkwürdigerweise aber ist sie so oft erfüllt, daß sie einen physiologischen Sinn zu haben scheint.

Wenn nun nur die an das Ferment-Protein gebundenen Substanzen chemisch reagieren, so ist die Anfangsgeschwindigkeit in jedem Fall proportional der Protein-Konzentration F

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot F \qquad [0]$$

Da aber im Fortschritt der Reaktionen die Reaktionsprodukte entstehen, die gleichfalls von dem Protein gebunden werden, so nimmt im Fortschritt der Reaktionen die Zahl der mit dem Ausgangsstoff verbundenen Proteinmoleküle ab und ist zum Beispiel bei halbem Umsatz auf die Hälfte gesunken. Allgemein ist der Bruchteil der mit dem Ausgangsstoff verbundenen Proteinmoleküle $F \cdot \frac{c}{C}$, wenn C die Anfangskonzentration und c die Konzentration zur Zeit t bedeutet; so daß also für den gesamten Verlauf der Reaktion die Differentialgleichung gilt:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot F \cdot \frac{c}{C} \qquad [1]$$

Ist die Reaktion umkehrbar, so ist die Rückreaktion von der Hinreaktion abzuziehen und wir erhalten:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot F \cdot \frac{c}{C} - k_2 \cdot F \cdot \frac{C-c}{C} \qquad [2]$$

wo $\frac{c}{C}$ der Bruchteil der Proteinmoleküle ist, der mit dem Ausgangsstoff verbunden ist und $\frac{C-c}{C}$ der Bruchteil der Proteinmoleküle, der mit dem Reaktionsprodukt verbunden ist.

Hat man nicht *einen*, sondern *zwei* Reaktionsteilnehmer, deren Konzentration sich im Verlauf der Reaktion ändert, so hat man, wenn die Ausgangskonzentration der beiden Reaktionsteilnehmer gleich C ist, anstatt [1]

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot F \cdot \left(\frac{c}{C}\right)^2, \qquad [3]$$

wo $\left(\frac{c}{C}\right)^2$ den Bruchteil der Proteinmoleküle bedeutet, der mit den *beiden* Ausgangsstoffen verbunden ist.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY MASS.

Setzt man in den Gleichungen [1] bis [3]

$$c = C$$

so geht jede der 3 Gleichungen über in

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot F \qquad [0]$$

das heißt, die Anfangsgeschwindigkeit ist immer unabhängig von C und nur abhängig von der Konzentration des Ferment-Proteins F.

Setzt man in den Gleichungen [1] und [2]

$$\frac{k_1 \cdot F}{C} = R_1 \text{ und } \frac{k_2 \cdot F}{C} = R_2 \qquad [4]$$

und in Gleichung [3]

$$\frac{k_1 \cdot F}{C^2} = R_1 \qquad [5]$$

so kann man schreiben:

statt [1] $$-\frac{dc}{dt} = R_1 \cdot c \qquad [1a]$$

statt [2] $$-\frac{dc}{dt} = R_1 \cdot c - R_2 (C - c) \qquad [2a]$$

statt [3] $$-\frac{dc}{dt} = R_1 \cdot c^2 \qquad [3a]$$

wo die Größen R die Bedeutung von Geschwindigkeitskonstanten haben und es nach der Form der Gleichungen scheint, als ob die Reaktionsteilnehmer nach dem Massenwirkungsgesetz in der Lösung reagierten. Variiert man aber C, dann zeigt sich, daß dies ein Irrtum ist. Denn die Anfangsgeschwindigkeiten bleiben konstant, während sie sich nach dem Massenwirkungsgesetz mit C ändern müßten, und die Größen R erweisen sich als umgekehrt proportional C oder C^2, während sie bei Variationen von C konstant bleiben müßten, wenn sie Geschwindigkeitskonstanten im Sinn des Massenwirkungsgesetzes wären.

Hat man R aus dem zeitlichen Verlauf einer Fermentreaktion in reziproken Minuten berechnet, so erhält man die Geschwindigkeitskonstanten k^1 und k^2, indem man F und C in die Gleichungen [4] oder [5] einsetzt. Drückt man dabei F und C in Molen/Volumeinheiten aus, so erhält k die Dimension

$$\frac{\text{Mole umgesetzter Substanz}}{\text{Mole Protein} \times \text{Minuten}}$$

und wird deshalb im folgenden auch als die „molare Wirksamkeit" = W molar eines Ferments bezeichnet.

Zum Schluß sei bemerkt, daß für jede der 3 Differentialgleichungen [1], [2] und [3] ausführliche experimentelle Belege vorliegen, insbesondere

für Gleichung [1] Biochem. Z. 282, 206 (1935),
für Gleichung [2] Biochem. Z. 310, 384 (1942),
für Gleichung [3] Biochem. Z. 303, 40 (1939).

Aus diesen Belegen wird man erkennen, daß die untersuchten Fermentreaktionen strenger gesetzmäßig verlaufen, als die meisten einfachen chemischen Reaktionen; und daß es keine Methoden gibt, die für kinetische Untersuchungen geeigneter wären, als die optischen Teste.

III. Spezifizität

Wenn bei der Gärung Pyridinnukleotid Wasserstoff überträgt oder wenn Adeninnukleotid Phosphorsäure überträgt, so hätte es so sein können, daß sich die Übertragung an *einem* für die Übertragung spezifischen Protein abspielte. Doch hat sich gezeigt, daß die Spezifizität noch weitgehender ist. Wenn Pyridinnukleotid bei der Gärung von dem diphosphorylierten Glycerinaldehyd an dem Protein des oxydierenden Gärungsferments hydriert worden ist, so wird es an einem andern Protein, dem Protein des reduzierenden Gärungsferments, durch Brenztraubensäure

wieder dehydriert; und wenn Adenosindiphosphat an dem *einen* Protein durch Phosphobrenztraubensäure phosphoryliert worden ist, so wird es an einem *andern* Protein durch Hexose wieder dephosphoryliert. Offenbar ist dieser höhere Grad von Spezifizität nur möglich, wenn die prosthetischen Gruppen der wasserstoff- oder phosphatübertragenden Fermente nicht fest, sondern dissociierend gebunden sind. Dies ist die Theorie der „Kofermente", die ich 1935 aufgestellt habe und die heute allgemein angenommen ist.

Anmerkung: Wenn jeder Teilvorgang der Gärung durch ein spezifisches Ferment bewirkt wird, so folgt aus dieser physiologischen Spezifizität keineswegs, daß die spezifischen Gärungsfermente nicht auch unphysiologische chemische Reaktionen hervorrufen können. Die Oxydation des Glycerinaldehyds zu Glycerinsäure durch das oxydierende Gärungsferment, die Reduktion des Dioxyacetons zu Glycerin durch das reduzierende Gärungsferment sind Beispiele[4] unphysiologischer Reaktionen, die zwar 1000- bis 10000mal langsamer verlaufen als die physiologischen Gärungsreaktionen, aber bei großen Konzentrationen an Fermenten doch gut meßbar sind. Als weitere und allgemeinere Beispiele könnte man die pharmakologischen Wirkungen anführen.

Was aber ist die Ursache der physiologischen Spezifizität der Fermente? Ist die Bindung der Substrate spezifisch oder ist die chemische Reaktion der gebundenen Substrate spezifisch?

Wir haben diese Frage geprüft, indem wir zu den Testen physiologische, aber nichtreagierende Substanzen zusetzten, zum Beispiel Brenztraubensäure zum Test des oxydierenden Gärungsferments und 3-Phosphoglycerinaldehyd zum Test des reduzierenden Gärungsferments; oder Triphospho-Pyridinnukleotid zum Test des oxydierenden Gärungsferments. Wären diese Substanzen gebunden worden, so hätten sie die Teste durch Verdrängung der Reaktionsteilnehmer hemmen müssen. Wir fanden in keinem Fall eine Hemmung und schließen daraus, daß die Ursache der spezifischen Wirkung die spezifische Bindung ist.

Dieses Ergebnis ist methodisch und theoretisch wichtig. In einem noch so komplizierten Gemisch von Substanzen und prothetischen Gruppen wird jede Fermentreaktion so ablaufen, als ob alle an ihr nicht teilnehmenden Stoffe nicht vorhanden wären. So kann im Leben keine physiologische Fermentreaktion eine andere stören.

IV. Beschreibung der optischen Teste

In der folgenden Liste der Teste stimmen die Nummern mit der Fermentliste in der Einleitung überein. Dort findet man auch die Gleichungen der Testreaktionen die deshalb in diesem Kapitel nicht wiederholt werden.

1. Zymohexase[5]

Hexosediphosphat, Pyridinnukleotid, Arsensäure und oxydierendes Gärungsferment sind die Komponenten des Tests, der ohne Zymohexase reaktionslos ist. Gibt man Zymohexase hinzu, so entsteht Triosephosphat, dessen Aldoform durch das oxydierende Gärungsferment zu Phosphoglyzerinsäure oxydiert wird, während gleichzeitig Dihydropyridinnukleotid, also Lichtabsorption bei 340 mμ entsteht. Ist dabei das oxydierende Gärungsferment im Überschuß, so ist die Spaltung des Hexosediphosphats geschwindigkeitsbestimmend und die Geschwindigkeit, mit

der der Logarithmus der Lichtschwächung zunimmt, ist der Konzentration der Zymohexase proportional.

Das Gesagte gilt für Muskel-Zymohexase. Ist das zu bestimmende Ferment Hefe-Zymohexase, so ist zu den Komponenten des Test noch Zinksulfat und Cystein hinzuzufügen, wodurch eine sehr kleine, aber definierte Konzentration an freiem Zinksalz erzeugt wird.

2. Isomerase[6]

Zu einer Lösung von Phosphat, Phosphoglycerinaldehyd und Pyridinnukleotid gibt man soviel Protein des oxydierenden Gärungsferments, daß sich das Gleichgewicht der Oxydationsreaktion

$$\frac{\text{Phosphat} \times \text{Phosphoglycerinaldehyd} \times \text{Pyridinnukleotid}}{\text{1,3-Diphosphoglycerinsäure} \times \text{Dihydropyridinnukleotid}}$$

schnell einstellt. Da bei der Reaktion hydriertes Pyridinnukleotid entsteht, so entsteht Lichtabsorption bei 340 mμ, die wir im Gleichgewicht messen.

Geben wir dann Isomerase zu der Gleichgewichts-Lösung, so wird Phosphoglycerinaldehyd zu Phosphodioxyaceton isomerisiert, das Gleichgewicht wird gestört und es muß hydriertes Pyridinnukleotid zurückreagieren, also Lichtabsorption bei 340 mμ verschwinden, bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts. Aus der Geschwindigkeit, mit der das erste Gleichgewicht in das zweite Gleichgewicht übergeht, kann man die Wirksamkeit der zugefügten Isomerase berechnen.

3. Oxydierendes Gärungsferment[7]

Zum Nachweis und zur Messung des oxydierenden Gärungsferments benutzen wir nicht die physiologische, sondern die irreversible Oxydationsreaktion, bei der (bei Gegenwart von Arsensäure) 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 3-Phosphoglycerinsäure oxydiert wird.

Es sind also die Komponenten des Tests 3-Phosphoglycerinaldehyd, Pyridinnukleotid und Arsensäure. Gibt man das Protein des oxydierenden Ferments hinzu, so beginnt die Reaktion und es entsteht Dihydropyridinnukleotid, also Lichtabsorption bei 340 mμ.

Zu beachten ist bei dem Test, daß das oxydierende Gärungsferment durch sehr kleine Mengen von Schwermetallsalzen geschädigt wird. Z. B. hemmen die kleinen Mengen Kupfersalz, die im Blutserum normalerweise vorkommen, das Ferment schon sehr erheblich. Es ist deshalb zweckmäßig, bei dem Test Komplexbildner zuzusetzen, von denen sich Pyrophosphat besonders bewährt hat. Pyrophosphat hemmt das Ferment nicht nur nicht, sondern es fördert die Wirkung durch Beseitigung hemmender Schwermetallsalze.

Wenn aber das oxydierende Ferment bei den optischen Testen als Hilfsferment zur Bestimmung anderer Fermente benutzt wird, so kann man wegen der Komplexbildner in Schwierigkeiten geraten, zum Beispiel wenn die andern Fermente zu ihrer Wirkung Magnesium oder Zink oder Eisen benötigen. Dann würde durch den Komplexbildner das oxydierende Ferment zwar gefördert, aber die zu bestimmenden Fermente würden gehemmt. In dem Test zur Bestimmung der Hefe-Zymohexase ist diese Schwierigkeit überwunden worden, indem wir Cystein als

Komplexbildner und außerdem Zinksulfat zusetzten; genug Zink, um die Hefe-Zymohexase zu aktivieren, aber so wenig Zink, daß das oxydierende Ferment, das bei diesem Test Hilfsferment ist, nicht geschädigt wurde. Die Spanne zwischen aktivierender und vergiftender Konzentration des Zinks war dabei durchaus nicht, wie man hätte befürchten können, eng; sondern 10mal soviel Zink, als zur Aktivierung der Zymohexase notwendig war, vergiftete das oxydierende Ferment nicht.

Doch ist bei der Verwendung von Cystein als Komplexbildner Vorsicht erforderlich, weil Cystein mit 3-Phosphoglycerinaldehyd unter Bildung von Thioacetalen oder Thiohalbacetalen reagiert. Trotzdem kann man beim Zymohexasetest Cystein als Komplexbildner verwenden, da hier der 3-Phosphoglycerinaldehyd in statu nascendi durch das oxydierende Ferment weggefangen wird; aber man könnte Cystein beim Test des oxydierenden Gärungsferments nicht verwenden, weil hier der Phosphoglycerinaldehyd, der hier zu den Komponenten des Tests gehört, Zeit hätte, mit dem Cystein zu reagieren.

4. Erstes dephosphorylierendes Ferment

Wie beim Isomerase-Test erzeugt man zunächst das Gleichgewicht der Oxydationsreaktion. Anders als beim Isomerase-Test setzt man dabei so wenig Phosphat zu, daß nur wenig hydriertes Pyridinnukleotid, also nur wenig Lichtabsorption bei 340 mμ entsteht. Entfernt man aber die 1,3-Diphosphoglycerinsäure aus der Lösung, indem man sie zu 3-Phosphoglycerinsäure dephosphoryliert, so geht die Oxydationsreaktion von links nach rechts weiter und es entsteht mehr hydriertes Pyridinnukleotid, also mehr Lichtabsorption bei 340 mμ.

Die Komponenten des Tests sind demnach: 3-Phosphoglycerinaldehyd, Pyridinnukleotid, Phosphat, Magnesiumsulfat und Adenosindiphosphat. Zunächst setzt man das Protein des oxydierenden Gärungsferments zu und mißt die nun auftretende Lichtabsorption bei 340 mμ. Hat man genug Protein zugesetzt, so wird diese Absorption sehr schnell (in einigen Sekunden) konstant. Fügt man dann das Protein des dephosphorylierenden Ferments zu, so nimmt die Lichtabsorption bei 340 mμ zu, und aus der Geschwindigkeit dieser Zunahme kann man die Wirksamkeit des dephosphorylierenden Ferments berechnen.

Mit Hilfe dieses Tests ist das Protein des ersten dephosphorylierenden Ferments unter meiner Leitung von TH. BÜCHER[7a] aus Hefe isoliert und kristallisiert worden.

5. Mutase[8]

Zu einer Lösung von 2-Phosphoglycerinsäure geben wir Magnesiumsulfat und soviel Enolase-Protein, daß sich das Gleichgewicht der Reaktion

$$\text{2-Phosphoglycerinsäure} \rightleftarrows \text{Phosphobrenztraubensäure} + H_2O$$

schnell einstellt. Da die Phosphobrenztraubensäure (vergl. Test 6) bei 240 mμ absorbiert, so entsteht bei der Reaktion Lichtabsorption bei 240 mμ, die wir im Gleichgewicht messen.

Fügen wir dann Mutase zu der Lösung, so wird das Gleichgewicht durch die Reaktion

$$\text{2-Phosphoglycerinsäure} \rightleftarrows \text{3-Phosphoglycerinsäure}$$

gestört, und Phosphobrenztraubensäure reagiert zu 2-Phosphoglycerinsäure zurück, das heißt, es verschwindet Lichtabsorption bei 240 mμ. Aus der Geschwindigkeit, mit der diese Absorption zurückgeht, kann man die Wirksamkeit der Mutase berechnen.

6. Enolase[8]

Gibt man zu einer Lösung von 2-Phosphoglycerinsäure und Magnesiumsulfat Enolase-Protein, so entsteht Phosphobrenztraubensäure, die als Enolverbindung bei 240 mμ absorbiert. Aus der Geschwindigkeit, mit der diese Absorption zunimmt, kann man die Wirksamkeit der Enolase berechnen.

Dies ist der einfachste unsrer optischen Teste. Doch hat er den Nachteil der Kurzwelligkeit. Bei 240 mμ absorbieren die Nukleinsäuren, die Proteine und viele andere Stoffe und der Betrag dieser Absorptionen ist in jedem Fall durch Messungen zur Zeit Null zu bestimmen. Bei Testen, die auf der Dihydropyridin-Absorption beruhen, sind derartige Nullpunktmessungen überflüssig, da Lichtabsorptionen im langwelligen ultraviolett bei 340 mμ gegen die Dihydropyridin-Absorption fast immer zu vernachlässigen sind.

7. Zweites dephosphorylierendes Ferment

Das Ferment, das die Phosphobrenztraubensäure dephosphoryliert, kann man auf zweierlei Art optisch bestimmen, bei 240 mμ und bei 340 mμ.

Bei 240 mμ. Die Komponenten des Tests sind: Phosphobrenztraubensäure, Magnesiumsulfat und Adenosindiphosphat. Gibt man das Protein des dephosphorylierenden Ferments hinzu, so verschwindet Phosphobrenztraubensäure, die vollständig enolisiert ist, und an ihre Stelle tritt Brenztraubensäure, die bei neutraler Reaktion nur zu einem kleinen Teil enolisiert ist. Es verschwindet also Lichtabsorption bei 240 mμ; und aus der Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, kann man die Wirksamkeit des dephosphorylierenden Ferments berechnen.

Bei dem Test stört der hohe Nullwert der Lichtabsorption, hervorgerufen durch das Adenin des Adenosindiphosphats. Adenin absorbiert bei 240 mμ etwa doppelt so stark wie Phosphobrenztraubensäure.

Bei 340 mμ. Die Komponenten des Tests sind: Phosphobrenztraubensäure, Magnesiumsulfat, Adenosindiphosphat, Dihydropyridinnukleotid und Protein des reduzierenden Gärungsferments. Dieses Gemisch ist reaktionslos. Fügt man aber das Protein des dephosphorylierenden Ferments hinzu, so entsteht Brenztraubensäure, die sofort von dem reduzierenden Ferment zu Milchsäure hydriert wird. Es verschwindet also Lichtabsorption bei 340 mμ, und aus der Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, kann man die Wirksamkeit des dephosphorylierenden Ferments berechnen.

Mit Hilfe dieses Tests hat NEGELEIN unter meiner Leitung das Protein des zweiten dephosphorylierenden Ferments aus Hefe isoliert und kristallisiert.

8. Reduzierendes Gärungsferment[9]

Brenztraubensäure und Dihydropyridinnukleotid sind die Komponenten des Tests, bei dem hydriertes Pyridinnukleotid, also Lichtabsorption bei 340 mμ, verschwindet.

Die Testreaktion ist zwar reversibel, aber sie verläuft, ihrem Zweck bei der Gärung entsprechend fast vollständig in der Richtung der Hydrierung der Brenztraubensäure. Geht man von äquivalenten Mengen Brenztraubensäure und hydriertem Pyridinnukleotid aus, so macht die Reaktion erst halt, wenn mehr als 99% der Brenztraubensäure zu Milchsäure hydriert worden sind. Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion ist 6×10^{-5} bei 22^0 und neutraler Reaktion.

Mit Hilfe des optischen Tests sind die Proteine der reduzierenden Gärungsfermente aus Muskeln und aus Tumoren der Ratte isoliert worden. Das Protein des reduzierenden Gärungsferment aus Hefe, dessen Substrat Acetaldehyd ist, kann Proteine, deren Substrat Brenztraubensäure ist, nicht ersetzen.

9. Adenosintriphosphatase

Gibt man zu Phosphobrenztraubensäure eine kleine Menge Adenosindiphosphat und das Protein des zweiten dephosphorylierenden Ferments, so wird eine kleine, dem Adenosindiphosphat äquivalente Menge Phosphobrenztraubensäure dephosphoryliert, und es bildet sich eine kleine Menge Adenosintriphosphat. Fügt man dann Adenosintriphosphatase hinzu, so wird das Triphosphat zu Diphosphat und freier Phosphorsäure gespalten, und es kann neue Phosphobrenztraubensäure dephosphoryliert werden, bis schließlich die gesamte Phosphobrenztraubensäure in Brenztraubensäure und freie Phosphorsäure gespalten worden ist.

Beobachten wir diese Vorgänge durch Absorptionsmessungen bei 240 mμ, so verschwindet zunächst, da nur wenig Phosphobrenztraubensäure verschwindet, nur wenig Lichtabsorption. Nach Zusatz der Adenosintriphosphatase aber verschwindet die gesamte von der Phosphobrenztraubensäure herrührende Lichtabsorption, und aus der Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, kann man die Wirksamkeit der Adenosintriphosphatase berechnen.

Es sei hervorgehoben, daß hier, anders als bei Test 7, die Absorption des Adenins des Adenosinphosphats nicht stört, da hier das Adenosinphosphat Katalysator und seine Konzentration so klein ist, daß sie optisch zu vernachlässigen ist.

10. Erstes phosphorylierendes Ferment

Es bleiben noch die Reaktionen, die den Kreislauf des gebundenen Phosphats schließen; die stufenweise Phosphorylierung der Hexose durch Adenosintriphosphat zu Hexose-6-Phosphat und Hexosediphosphat. Der optische Nachweis der beiden Reaktionen gelang uns bisher nur für Lebedewsaft, aber nicht für Muskelsaft.

Die Komponenten des ersten Tests waren Glukose, Adenosintriphosphat, Magnesiumsulfat und zwei gärungsfremde Substanzen, Triphospho-Pyridinnukleotid und ein Protein, das ich, ehe wir die Bindung der Kofermente an die Proteine entdeckt hatten, „Zwischenferment" genannt habe. Es ist die Protein-Komponente des Ferments, das 6-Phospho-Glukose zu 6-Phosphohexonsäure oxydiert.

Ohne das Protein des ersten phosphorylierenden Ferments ist der Test reaktionslos. Fügt man aber das Protein hinzu, so entsteht 6-Phospho-Glukose, die sofort zu 6-Phosphohexonsäure oxydiert wird:

Phospho-Glukose + Pyridinnukleotid + H_2O = Phosphohexonsäure + Dihydropyridinnukleotid

Es entsteht also, wenn die Glukose zu Monophosphat phosphoryliert wird, Lichtabsorption bei 340 mμ, und aus der Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, kann man die Wirksamkeit des ersten phosphorylierenden Ferments berechnen.

Mit der gleichen Hilfsreaktion haben wir die Mutierung des Coriesters

1-Phosphoglukose ⇄ 6-Phosphoglukose

optisch nachgewiesen. Die Komponenten des Tests waren dabei Coriester, Triphospho-Pyridinnukleotid, Magnesiumsulfat und Zwischenferment. Bei Zusatz des Mutase-Proteins entstand dann Lichtabsorption bei 340 mμ.

11. Zweites phosphorylierendes Ferment.

Um die Phosphorylierung von Hexosemonophosphat zu Hexosediphosphat optisch nachzuweisen, fügen wir Zymohexase, Arsensäure und oxydierendes Gärungsferment zu den Testlösungen hinzu. Sind die beiden Hilfsfermente im Überschuß, so wird das entstehende Hexosediphosphat sofort gespalten, und die Aldoform des Triosephosphats wird sofort zu Phosphoglycerinsäure oxydiert, wobei Dihydropyridinnukleotid, also Lichtabsorption bei 340 mμ entsteht. Aus der Geschwindigkeit, mit der diese Lichtabsorption zunimmt, kann man die Wirksamkeit des phosphorylierenden Ferments berechnen.

Die Komponenten des Tests sind also Hexosemonophosphat, Magnesiumsulfat und Adenosintriphosphat; und als Hilfssystem Zymohexase, Pyridinnukleotid, Arsensäure und Protein des oxydierenden Gärungsferments. Gibt man zu dieser Lösung, die reaktionslos ist, Protein des zweiten phosphorylierenden Ferments, so entsteht Hexosediphosphat, und die Spaltung und die Oxydation der Spaltungsprodukte beginnt.

12. Carboxylase.

Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, daß man auch Carboxylase optisch bestimmen kann. Wir lösen Brenztraubensäure in m/10 Acetatpuffer von pH 5,3 zu einer Konzentration von 1/200 molar, messen die Lichtabsorption bei 240 mμ für eine Schichtdicke von 0,5 cm und geben dann Carboxylase zu der Lösung. Dann verschwindet die Lichtabsorption in dem Maße, als die Brenztraubensäure zu Acetaldehyd und Kohlensäure gespalten wird. Die Methode beruht auf der Tatsache, daß Brenztraubensäure bei pH 5,3 zwar nur zu einem kleinen Teil, aber doch optisch noch ausreichend enolisiert ist. ($\beta_{\text{molar}} = 6 \cdot 10^5$ cm²/Mole Brenztraubensäure).

V. Vorbemerkung über die kristallisierten Fermente

Die gut ausgearbeiteten Isolierungsverfahren von Gärungsfermenten sind ganz einfache Verfahren. Das oxydierende Gärungsferment der Hefe, die Enolase der Hefe, die Zymohexase des Muskels kann man heute grammweise mit einem Arbeitsaufwand von nur einigen Tagen in reinem Zustand gewinnen; und man kann die reinen Fermente, sofern sie von proteolytischen Fermenten völlig befreit

sind, bei 0° jahrelang ohne Wirkungsverlust aufbewahren. Die Unbeständigkeit der Fermente ist eine Schwierigkeit, die überwunden ist.*

Will man ein Gärungsferment für katalytische Versuche benutzen, so kommt es darauf an, daß die andern Gärungsfermente entfernt worden sind; daß also zum Beispiel das oxydierende Gärungsferment frei ist von Isomerase und Zymohexase, die Enolase frei ist von Mutase usw. Der hierfür erforderliche Reinheitsgrad ist meistens nach einmaligem Umkristallisieren erreicht.

Dagegen ist ein höherer Reinheitsgrad und vielfaches Umkristallisieren erforderlich, wenn man die stöchiometrischen Reaktionen der Fermente, auf denen ihre katalytischen Reaktionen beruhen, untersuchen will. Dann sind wegen des großen Molekulargewichts der Fermente und wegen des kleinen Molekulargewichts der Wirkungsgruppen die reinsten Fermente noch zu unrein und Verunreinigungen von 0,1 %, in der gewöhnlichen Chemie eine erlaubte Fehlergrenze, können Wirkungsgruppen vortäuschen oder die Entdeckung von Wirkungsgruppen verhindern.

Nach dem Gesagten ist es auch klar, daß die Elementaranalyse keine Methode ist, mit der das Problem der Wirkungen der Fermente untersucht werden kann. Doch haben wir wegen der Klassifizierung der Ferment-Proteine unsere Kristalle analysiert; die Ergebnisse sind in den Originalarbeiten mitgeteilt. Erwähnenswert ist, daß wir in den meisten Fermentproteinen etwa 1 % Schwefel, in dem Enolaseprotein aber nur 0,38 % Schwefel fanden.

Die Ultraviolett-Banden der Fermentproteine, die von dem Tryptophan und dem Tyrosin der Proteine herrühren, fanden wir von bemerkenswert gleicher Höhe, zum Beispiel:

	molarer Absorptionskoefficient bei 280 mμ $\frac{cm^2}{g}$
Zymohexase aus Muskeln	$2{,}0 \times 10^3$
Enolase-Protein aus Hefe	$2{,}06 \times 10^3$
Protein des oxydierenden Gärungsferments aus Hefe	$2{,}16 \times 10^3$

VI. Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsferments[7]

Das Protein des oxydierenden Gärungsferments ist 1939 aus Hefe mit Hilfe des optischen Tests 3 isoliert worden. Zwei neue für die Fermentchemie wichtige Methoden sind dabei entwickelt worden: die Fraktionierung von Ferment-Proteinen als Nukleoproteide durch Variation der Konzentration der Wasserstoffionen und die Kristallisation von Ferment-Proteinen aus Ammonsulfat unter Zusatz von starkem Ammoniak.

Wie die meisten Ferment-Proteine ist auch das Protein des oxydierenden Gärungsferments in Wasser sehr leicht löslich, während die Nukleinsäureverbindung, die etwa 20 % Nukleinsäure enthält, in salzarmem Wasser bei saurer Reaktion fast unlöslich ist. Befreit man also Hefesaft, der in der Regel reichlich

* *Zusatz 1961.* Im wesentlichen nach diesen Methoden werden die reinen Stoffwechselfermente gewonnen, die C. F. Böhringer (Mannheim-Waldhof), sehr zum Nutzen der Wissenschaft, seit einigen Jahren in den Handel bringt.

Nukleinsäure enthält, durch irgendeine Vorbehandlung von dem Hauptteil seiner Salze, setzt zur Sicherheit noch nukleinsaures Natrium hinzu und säuert mit Essigsäure an, so fallen Nukleoproteide aus und zwar je nach der Azidität, bis zu der angesäuert wurde, verschiedene Nukleoproteide. Bei pH 4,5 fällt das Nukleoproteid des Proteins des oxydierenden Ferments. Man kann es ohne Wirkungsverlust auf der Zentrifuge waschen, es dadurch von vielen Begleitstoffen befreien und es auch, was methodisch oft von Vorteil ist, schnell beliebig stark konzentrieren.

Um das Protein aus seiner Nukleinsäureverbindung wieder in Freiheit zu setzen, suspendieren wir das Nukleoproteid in wenig Wasser, lösen es durch tropfenweisen Zusatz von Natronlauge bis pH 6 und fügen Protaminsulfat hinzu. Dabei fällt die Nukleinsäure als Protaminsalz aus, während das Protein in Lösung bleibt.

Wegen der folgenden Kristallisation ist es wichtig, daß die Nukleinsäure möglichst vollständig abgetrennt wird. Wir prüfen den Erfolg unsrer Trennungsmethode optisch, indem wir die Lichtabsorption der Lösungen, die von Nukleinsäure befreit werden sollen, bei 260 mμ und 280 mμ vergleichen. Proteine haben ihr Maximum bei 280 mμ, während das Maximum der Nukleinsäureabsorption bei 260 mμ liegt.

Zur Kristallisation versetzen wir eine 10 %ige Lösung des Proteins bis zur Halbsättigung mit Ammonsulfat und fügen zu der klaren Lösung $^1/_{20}$ bis $^1/_{10}$ ihres Volumens Normal-Ammoniak. Dann erscheinen bald Nadeln und nach einigen Stunden ist die Flüssigkeit zu einem Brei reiner Kristalle erstarrt. Auch in andern Fällen hat sich diese Methode der Kristallisation bewährt.

Das Protein enthält keinen Phosphor. Es verbrennt ohne Rückstand, enthält also keine Metalle. Auch für dissociierende Bindung von Metallen haben sich bisher keine Anhaltspunkte ergeben.

Die prosthetische Gruppe des Ferments ist Diphospho-Pyridinnukleotid, dessen hydrierte und nicht hydrierte Formen gleich fest von dem Protein gebunden werden. Die Gleichgewichtskonstante dieser Bindungen hat bei 25° und pH 7,5 den Wert:

$$K = \frac{\text{Protein} \times \text{Nukleotid}}{\text{Proteid}} = 3{,}2 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{Mole}}{\text{Liter}}\right].$$

Die molare Wirksamkeit in der Richtung der Gärung beträgt bei 20° und pH 7,4, wenn wir mit dem von Bücher mit der Streulichtmethode gefundenen Mol. Gewicht 96000 rechnen:

$$W_{molar} = 17000 \text{ Mole Substrat/Mole Ferment} \times \text{Minuten}.$$

VII. Oxydationsreaktion der Gärung

Als wir das Nikotinsäureamid und seine wasserstoffübertragende Funktion bei der Gärung entdeckt hatten, war es sofort klar, und ließ es sich durch einfache Versuche beweisen, daß die Gärungsreaktion, in der das hydrierte Nikotinsäureamid seinen Wasserstoff wieder abgibt, die Hydrierung des Acetaldehyds oder der Brenztraubensäure ist:

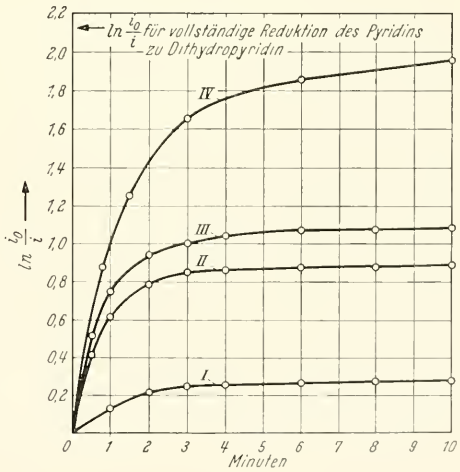
Dihydro-Nikotinsäureamid + Acetaldehyd = Nikotinsäureamid + Aethylalkohol
Dihydro-Nikotinsäureamid + Brenztraubensäure = Nikotinsäureamid + Milchsäure.

Dagegen wurde die Gärungsreaktion, in der das Nikotinsäureamid den Wasserstoff aufnimmt — die Oxydationsreaktion der Gärung — erst aufgeklärt, nachdem das Protein des oxydierenden Ferments isoliert worden war. Warum diese Isolierung die notwendige Vorbedingung war, wird sich aus dem folgenden ergeben.

Der Schlüssel-Versuch für die Oxydationsreaktion, ausgeführt mit kristallisiertem Protein, ist in Figur 2 graphisch dargestellt. Man erkennt aus der Figur, daß die Oxydationsreaktion eine reversible Reaktion ist; daß die Phosphorsäure an der Reaktion beteiligt ist; und daß die Oxydation des Substrats um so vollständiger verläuft, je höher die Konzentration der freien Phosphorsäure ist.

Qualitativ kann man die Beteiligung des Phosphats an der Oxydationsreaktion der Gärung durch einen einfachen Versuch demonstrieren. Im Licht der Quecksilberlinie 366 mμ zeigt das Dihydro-Pyridinnukleotid eine lebhafte weiße Fluorescenz, während die andern Teilnehmer der Oxydationsreaktion hier nicht fluorescieren. Läßt man also die Oxydationsreaktion vor dem Schwarzglas einer Analysen-Quecksilberlampe vor sich gehen, so kann man den Verlauf der Reaktion durch Beobachtung der Fluorescenz sehen.

Man löse zum Beispiel einige mg 3-Phosphoglycerinaldehyd und einige $^1/_{10}$ mg Pyridinnukleotid in 3 cm³ m/100 Pyrophosphat von pH 7,9 und bringe die Lösung vor das Schwarzglas der Lampe. Die Lösung bleibt dunkel, auch wenn man einige γ des Proteins des oxydierenden Gärungsferments hinzufügt. Läßt man aber einen Tropfen einer m/10 Orthophosphatlösung vorsichtig in die Lösung hineinfallen, so sinkt der Tropfen hell leuchtend zu Boden und schüttelt man dann um, so leuchtet die ganze Lösung hell auf.



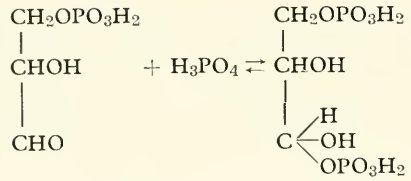
Figur 2. Oxydationsreaktion der Gärung 3-Phosphoglycerinaldehyd + Pyridinnukleotid + Phosphat. Bei t_0 3γ des Proteins des oxydierenden Gärungsferments. ln $\frac{i_0}{i}$, der Logarithmus der Lichtschwächung, ist der Konzentration des Dihydro-Pyridinnukleotids proportional. λ 340 mμ; d = 0,557 cm; 20°.

Kurve I:
$0{,}87 \cdot 10^{-6}$ Mole Phosphat pro cm³ · pH 7,4.
Kurve II:
$1{,}68 \cdot 10^{-5}$ Mole Phosphat pro cm³ · pH 7,4.
Kurve III:
$3{,}36 \cdot 10^{-5}$ Mole Phosphat pro cm³ · pH 7,4.
Kurve IV:
$3{,}36 \cdot 10^{-5}$ Mole Phosphat pro cm³ · pH 8,45

Zur Erklärung der Phosphatwirkung habe ich angenommen*, daß sich zunächst Phosphorsäure an die Aldehydgruppe des Phosphoglycerinaldehyds anlagert, unter Bildung eines Phosphorsäureesters des Orthoaldehyds:

---

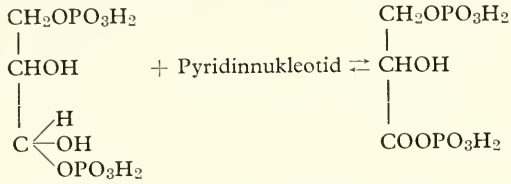
* *Zusatz 1961.* Ist inzwischen bewiesen worden. Vergl. Arbeiten 23 und 24 dieses Buchs.



[1]

Wahrscheinlich ist dies keine Fermentreaktion, sondern eine in der Lösung von selbst verlaufende Reaktion. Zur Begründung führe ich an[10], daß nicht phosphorylierter Glycerinaldehyd in wässriger neutraler Lösung — also ohne Mitwirkung eines Ferments — mit Phosphat reagiert und daß durch diese Reaktion die Aldehydgruppe des Glycerinaldehyds gegen Oxydationsmittel aktiviert wird.

Ist durch die Reaktion [1] der diphosphorylierte Glycerinaldehyd entstanden, so wird er von dem Protein des oxydierenden Gärungsferments gebunden und wird hier von dem Pyridinnukleotid zu diphosphorylierter Glycerinsäure oxydiert:



[2]

Die 1,3-Phosphoglycerinsäure haben wir isoliert[11]. Sie ist unbeständig, zerfällt schon in wäßriger Lösung bei neutraler Reaktion und reagiert so schnell an dem Ferment zurück, daß man einen merklichen Umsatz von links nach rechts nur durch relativ große Konzentrationen an Phosphat und 3-Phosphoglycerinaldehyd erzielen kann.

Deshalb ist es notwendig, daß das Protein des oxydierenden Gärungsferments rein ist. Enthält es Isomerase oder Zymohexase, so wird der 3-Phosphoglycerinaldehyd fast vollständig zu Phospho-Dioxyaceton isomerisiert und zu Hexosediphosphat kondensiert und die noch übrigbleibende Konzentration des 3-Phosphoglycerinaldehyds reicht nicht mehr aus für einen merklichen Umsatz von links nach rechts in der Reaktion [2].

Die Arsensäure kann die Phosphorsäure bei der Oxydationsreaktion insofern ersetzen, als 3-Phosphoglycerinaldehyd auch bei Zusatz von Arsensäure oxydiert wird. Aber das Oxydationsprodukt, von dem man erwarten sollte, daß es eine in 1-Stellung arsenylierte 3-Phosphoglycerinsäure wäre, ist gewöhnliche 3-Phosphoglycerinsäure; und da 3-Phosphoglycerinsäure nicht zurückreagiert, so ist die Oxydationsreaktion bei Gegenwart von Arsensäure eine nicht reversible vollständig verlaufende Reaktion.

Wahrscheinlich reagiert die Arsensäure in den Reaktionen [1] und [2] genauso wie die Phosphorsäure, aber die in 1-Stellung arsenylierte 3-Phosphoglycerinsäure ist so unbeständig, daß sie schon in statu nascendi in Arsensäure und 3-Phosphoglycerinsäure zerfällt. So kommt es, daß die Arsensäure, thermodynamisch betrachtet, kein Teilnehmer, sondern Katalysator der Oxydationsreaktion ist.

Dies ist nur eine Theorie. Aber es spricht für die Theorie, daß sie die bisher völlig rätselhafte Wirkung der Arsensäure bei der Oxydationsreaktion einfach und einleuchtend erklärt.

VIII. Harden-Youngsche Gleichung

Wenn bei der Oxydationsreaktion der Gärung die 1,3-Phosphoglycerinsäure entstanden ist, so folgt im weiteren Verlauf der Gärung die Dephosphorylierung der Säure in zwei Schritten: in dem ersten Schritt wird sie in 1-Stellung dephosphoryliert und es entsteht 3-Phosphoglycerinsäure, die dann über 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphobrenztraubensäure übergeht. In dem zweiten Schritt wird die Phosphobrenztraubensäure zu Brenztraubensäure dephosphoryliert. Jede der beiden Dephosphorylierungen geschieht durch Adenosindiphosphat, das selbst dabei zu Adenosintriphosphat phosphoryliert wird. Im ganzen entstehen jedesmal, wenn 1 Molekül Hexose zu Milchsäure oder Alkohol und Kohlensäure gespalten wird, 4 Moleküle Adenosintriphosphat.

Gehen wir, indem wir den Kreislauf der Gärungsreaktionen verfolgen, von diesen 4 Molekülen Adenosintriphosphat aus, so werden in gärenden Zellen 2 Moleküle zu Adenosindiphosphat und Phosphorsäure hydrolysiert, während die andern beiden 1 Molekül Hexose zu Hexosediphosphat phosphorylieren. Würde diese Zweiteilung der Reaktionen des Adenosintriphosphats im Leben nicht eingehalten, so würde die Gärung schnell zum Stillstand kommen: durch Mangel an *gebundenem* Phosphat, wenn zuviel Adenosintriphosphat hydrolysiert würde; oder durch Mangel an *freiem* Phosphat, wenn zuviel Adenosintriphosphat zur Phosphorylierung der Hexose verwendet würde.

Wird aber die Zweiteilung eingehalten und haben sich die 4 Moleküle Adenosintriphosphat, von denen wir ausgingen, im Kreislauf der Gärungsreaktionen wieder zurückgebildet, so sind das freie und das gebundene Phosphat konstant geblieben, während 1 Molekül Hexose verschwunden ist und 2 Moleküle Milchsäure oder Alkohol und Kohlensäure entstanden sind. In der lebenden Zelle ist also das Phosphat, thermodynamisch betrachtet, Katalysator, sowohl das gebundene als auch das freie Phosphat.

Anders in Zellextrakten, zum Beispiel in Lebedewsaft von Hefezellen, in dem die Adenosintriphosphatase im wesentlichen fehlt. Hier reagieren von den 4 Molekülen Adenosintriphosphat nicht 2, sondern alle 4 Moleküle mit Hexose und es entstehen nicht 1 Molekül, sondern 2 Moleküle Hexosediphosphat. Verfolgt man unter diesen Umständen die Gärungsreaktionen bis zur Wiederbildung der 4 Moleküle Adenosintriphosphat, so sind hier weder das freie noch das gebundene Phosphat konstant geblieben; sondern das freie Phosphat hat (bei der Oxydationsreaktion) um 2 Moleküle abgenommen, während das gebundene Phosphat um 2 Moleküle, nämlich um 1 Molekül Hexosediphosphat, zugenommen hat. Die Bilanz für einen Kreislauf der Gärungsreaktionen ist also:

$$\begin{array}{l} 2\ \text{Phosphat} + 1\ \text{Hexose} = 1\ \text{Hexosediphosphat} + 2\ \text{Wasser} \\ \qquad\qquad\quad 1\ \text{Hexose} = 2\ \text{Kohlensäure} + 2\ \text{Alkohol} \\ \hline \text{Bilanz: } 2\ \text{Phosphat} + 2\ \text{Hexose} = 1\ \text{Hexosediphosphat} + 2\ \text{Wasser} + 2\ \text{Kohlensäure} + 2\ \text{Alkohol.} \end{array}$$

Dies ist die berühmte Gleichung von HARDEN und YOUNG[12], die man heute nach langen Jahren endlich versteht. Heute weiß man auch, warum es kein Einwand gegen die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung war, daß lebende Hefe in phosphatfreier Lösung beliebige Mengen Zucker vergären kann. Denn im

Leben wirkt das Phosphat katalytisch; in Hefesaft wirkt es stöchiometrisch, weil in Hefesaft das Ferment fehlt, das die bei der Oxydationsreaktion gebundene Phosphorsäure wieder frei macht. Diesem glücklichen Umstand, daß in Hefesäften von den 12 Gärungsfermenten der Hefe *eines* fehlt, verdankt man also die weittragende Entdeckung von HARDEN und YOUNG.

Anmerkung: Den Versuch von Harden und Young, der die stöchiometrische Wirkung der Phosphorsäure bei der Gärung demonstriert und den man jedem Studenten der Biochemie zeigen sollte, führen wir folgendermaßen aus: In einem Manometergefäß mit Ansatzbirne werden 2 cm^3 Lebedewsaft, der 5% Glukose enthält und dessen pH 6 ist, solange geschüttelt, bis die Gärung sehr schwach geworden ist. Gibt man dann aus der Ansatzbirne 5 Mikromole Phosphat in den Hauptraum (wobei pH 6 bleiben soll), so setzt alsbald eine stürmische Entwicklung von Gärungskohlensäure ein, die wieder aufhört, wenn 5 Mikromole Kohlensäure entwickelt worden sind, also geradesoviel als man Phosphat zugegeben hatte. Würde hier die Phosphorsäure katalytisch wirken wie in lebenden Zellen, so würde die schnelle Gärung erst aufhören, wenn der gesamte Zucker des Lebedewsaftes vergoren wäre; wenn also nicht 5, sondern 1100 Mikromole Kohlensäure entwickelt worden wären.

IX. Kristallisation des Enolase-Proteins[8]

Das Enolase-Protein ist mit Hilfe des optischen Tests 6 aus Hefe isoliert worden. Eine neue Methode der Kristallisation von Ferment-Proteinen ist dabei entdeckt worden: die Kristallisation der Proteine als Quecksilbersalze.

Ich kam auf die Methode bei Versuchen, das Enolase-Protein durch Fällung mit Ammonsulfat zu kristallisieren. Dabei waren den amorphen Niederschlägen immer dann vereinzelte Kristalle beigemischt, wenn die Proteinlösungen vorher mit MERCKS Faserton geschüttelt worden waren. Da nun Mercks Faserton unter Zusatz von Quecksilbersalzen hergestellt wird, und da Proteinlösungen in Berührung mit diesem Faserton Quecksilbersalze aufnehmen, so setzten wir bei unsern Kristallisationsversuchen Quecksilbersalze zu. Tatsächlich fiel nach Zusatz von viel Mercurisulfat zu einer Lösung von Protein in ammoniakalischem Ammonsulfat das gesamte Enolase-Protein als kristallinisches Quecksilbersalz aus. Kein anderes Metall, auch nicht Cadmium, konnte hierbei das Quecksilber vertreten. Die Methode ist seitdem mit Erfolg auf andere Ferment-Proteine angewandt worden, ist also nicht spezifisch für Enolase-Protein.

BÜCHER und LÜTTGENS fanden in dem Quecksilbersalz der Enolase 0,3% Quecksilber, also in 66000 Gramm 1 Grammatom Quecksilber. Dies stimmt zu Molekulargewichtsbestimmungen mit der Streulichtmethode, bei denen Bücher für das Enolase-Protein 68000 fand.

Das Quecksilbersalz der Enolase ist katalytisch unwirksam. Entfernt man aber das Quecksilber durch Dialyse gegen Kaliumcyanid oder gegen Cystein, so findet man die volle Wirksamkeit des Ausgangsmaterials wieder, falls es rein war; oder eine höhere Wirksamkeit, falls das Ausgangsmaterial noch unrein war. Bei der Isolierung des Enolase-Proteins war die Kristallisation als Quecksilbersalz der letzte Schritt; die Wirksamkeit des Proteins stieg dabei auf das doppelte.

Später habe ich beobachtet, daß man das Quecksilbersalz des Enolase-Proteins auch direkt, ohne das Quecksilber vorher zu entfernen, im Enolase-Test verwenden kann, wenn man der Testlösung eine kleine, etwas mehr als äquivalente Menge

Cystein zusetzt. Dann entzieht das Cystein dem Quecksilbersalz sofort das Quecksilber, und die Ferment-Wirkung setzt ohne nachweisbare Verzögerung ein. Es sei darauf hingewiesen, daß Cystein und das Quecksilbersalz des Cysteins bei der Wellenlänge des Enolase-Tests (240 mμ) stark absorbieren; daß aber diese Absorption wegen der sehr kleinen Cysteinmengen, die zur Zerlegung der Quecksilberverbindung notwendig sind, nicht stört.

Schon bei unsern ersten Vorversuchen mit roher Enolase fanden wir, daß an der Enolasewirkung eine dialysierbare Substanz beteiligt ist. Tatsächlich ist die aktive Enolase ein dissociierendes Magnesium-Proteid, dessen Dissociationskonstante bei 20° und pH 7,4 den Wert hat:

$$K = c_{Mg} \cdot \frac{\text{Protein}}{\text{Proteid}} = 0{,}6 \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{Mole Mg}}{\text{Liter}}\right].$$

Unter den gleichen äußeren Bedingungen ist die molare Wirksamkeit der Enolase in der Richtung der Gärung, berechnet mit dem Molekulargewicht 68000

$$W_{molar} = 6800 \text{ Mole Substrat/Mole Ferment} \cdot \text{Minuten}.$$

X. Fluoridhemmung der Enolase

Seit Effront im Jahre 1890 entdeckte, daß Fluoride die Gärung hemmen, ist die Fluoridhemmung viel diskutiert worden, zuletzt von Meyerhof und Lohmann, die fanden, daß die Enolase besonders fluoridempfindlich ist und die daran die richtige Vermutung knüpften, die Fluoridhemmung der Gärung beruhe auf der Fluoridhemmung der Enolase. Niemand aber konnte den chemischen Mechanismus der Fluoridhemmung erklären, ehe der Aktivator der Enolase gefunden war.

Gehen wir bei unsern Erklärungsversuchen von dem physiologischen Aktivator der Enolase, dem Magnesium aus, so liegt die Annahme nahe, daß Fluorid das freie Magnesiumsalz der Lösungen zu Magnesiumfluorid binde und dadurch die Dissociation des Ferments in inaktives Protein und Magnesiumsalz bewirke.

Dann müßte um so mehr Fluorid zur Hemmung der Enolase notwendig sein, je größer die Konzentration des Magnesiums wäre. Wir fanden das Gegenteil. Zum Beispiel waren die Fluorid-Konzentrationen, die halbe Hemmung der Enolase bewirkten, bei pH 6,74 in m/20 Phosphat:

$MgSO_4$ [Mole/Liter]	Halbwerts-Konzentration des Fluorids [Mole/Liter]
1×10^{-3}	$3{,}9 \times 10^{-4}$
$2{,}7 \times 10^{-3}$	$2{,}0 \times 10^{-4}$
27×10^{-3}	$0{,}6 \times 10^{-4}$

Es war also um so weniger Fluorid zur Hemmung der Enolase notwendig, je höher die Konzentration des Magnesiums war. Waren 27 Millimole Magnesiumsulfat im Liter Lösung, so hemmten 0,06 Millimole Fluorid die Enolase zur Hälfte,

während offenbar in diesem Fall die Konzentration des Magnesiumsulfats durch das Fluorid nicht vermindert werden konnte.

Ein zweites merkwürdiges Ergebnis war es, daß wir gar keine Hemmung durch Fluorid fanden, wenn wir den Phosphatpuffer durch Bikarbonatpuffer ersetzten. Wurde aber Phosphat zu dem Bikarbonat hinzugefügt, so trat die Fluoridhemmung wieder auf. Zum Beispiel fanden wir bei pH 7,34 in m/20 Bikarbonat:

	Mole/Liter	Mole/Liter	Mole/Liter
c_{Mg}	$2{,}7 \times 10^{-3}$	$2{,}7 \times 10^{-3}$	$2{,}7 \times 10^{-3}$
$c_{Fluorid}$	0	$1{,}7 \times 10^{-3}$	$1{,}7 \times 10^{-3}$
$c_{Phosphat}$	$1{,}0 \times 10^{-3}$	0	$1{,}0 \times 10^{-3}$
	↓	↓	↓
	keine Hemmung	keine Hemmung	71% Hemmung

Aus derartigen Versuchen ergab sich, daß die Fluoridhemmung der Enolase durch eine Substanz bewirkt wird, die Phosphat, Magnesium und Fluorid enthält und zwar wahrscheinlich im Verhältnis 1:2:2; und daß dieses komplexe Magnesiumsalz das Magnesium von der Enolase verdrängt, etwa:

Magnesiumfluorophosphat + Magnesiumenolase $\rightleftarrows$ Magnesiumfluorophospho-Enolase + Magnesiumsalz

Indessen muß ich erwähnen, daß ich eine Erscheinung beobachtet habe, die zu dieser Theorie nicht zu stimmen scheint. Bringt man Enolase-Protein in eine Testlösung, die Phosphat, Magnesium und Fluorid enthält, so dauert es etwa 1 Minute, bis die Fluoridhemmung voll entwickelt ist; und bringt man das gehemmte Ferment in eine fluoridfreie Lösung zurück, so dauert es etwa 1 Minute bis die Fluoridhemmung wieder völlig verschwunden ist. Eine gegenseitige Verdrängung von Salzen sollte nicht so lange Zeite beanspruchen.

XI. Kristallisation der Muskel-Zymohexase[5]

Muskel-Zymohexase wurde mit Hilfe des Tests 1 isoliert und aus ammoniakalischem Ammonsulfat kristallisiert.

Das Molekulargewicht fand BÜCHER mit der Streulichtmethode etwa 150000. Bezogen auf diesen Wert, beträgt die molare Wirksamkeit des Ferments in der Richtung der Gärung:

W_{molar} bei 20^0: 2000 Mole Hexosediphosphat / Mole Ferment × Minuten
W_{molar} bei 38^0: 11000 Mole Hexosediphosphat / Mole Ferment × Minuten

Dies ist die kleinste molare Wirksamkeit eines Gärungsferments, die wir bisher gefunden haben. Vielleicht hängt dies damit zusammen, daß die Zymohexase Kohlenstoffverbindungen trennt, während die bisher isolierten Gärungsfermente Phosphat übertragen oder Wasserstoff übertragen oder Wasser abspalten.

Aus Gründen, die sich aus dem Folgenden ergeben werden, haben wir die Frage der Beteiligung von Schwermetallen an der Wirkung der Muskel-Zymohexase untersucht. Wir fanden:

1. Muskel-Zymohexase kann gegen die Komplexbildner Blausäure, Cystein und Pyrophosphat ohne Wirkungsverlust dialysiert werden.

2. Muskel-Zymohexase wird durch Zusatz von Komplexbildnern zur Testlösung nicht gehemmt.

3. Muskel-Zymohexase, zweimal umkristallisiert, enthielt in 100 mg 2 γ Kupfer, 2 γ Zink und 1 γ Eisen.

Addieren wir die drei Metalle und rechnen die Metalle und das Ferment in Mikromole um, so ergibt sich, daß 0,67 Mikromole Ferment etwa 0,08 Mikromole Schwermetall, also keine stöchiometrischen Mengen Schwermetall enthalten.

Die drei Ergebnisse ergänzen sich und scheinen zu beweisen, daß an der Wirkung der Muskel-Zymohexase Schwermetalle nicht beteiligt sind.

XII. Das Problem der Wirkungsgruppe

Es ist bisher ein Ergebnis unsrer Untersuchungen über Fermente gewesen, daß die Wirkung der Fermente auf chemischen Zwischenreaktionen beruht; und daß die Ferment-Proteine keine Teilnehmer dieser chemischen Zwischenreaktionen sind.

Wenn zum Beispiel die Phenoloxydase Brenzkatechin zu Orthochinon oxydiert, so wäre es möglich gewesen, daß das Ferment-Protein das Brenzkatechin oxydierte und daß das reduzierte Ferment-Protein durch molekularen Sauerstoff reoxydiert würde. In Wirklichkeit jedoch oxydiert Kupfer, an Protein gebunden, das Brenzkatechin; und in Wirklichkeit wird Kupfer, an Protein gebunden, durch molekularen Sauerstoff reoxydiert. Das entsprechende gilt für die rein organisch aufgebauten sauerstoffübertragenden Fermente, die gelben Fermente, sowie für die sehr große Zahl der wasserstoffübertragenden Fermente, die Pyridin-Proteide.

Deshalb wird man, wenn man ein Ferment isoliert hat, nicht ruhen, bis man den Nichtproteinteil gefunden hat: das „Koferment", wenn der Teil dissociierend gebunden ist oder die „prosthetische Gruppe", wenn er fester gebunden ist. Erst dann kann man hoffen, die Zwischenreaktionen, auf denen die Fermentwirkung beruht, zu entdecken und damit die Fermentwirkung chemisch zu verstehen.

Die Muskel-Zymohexase ist das erste Ferment gewesen, dessen Nichtproteinteil wir gesucht, aber nicht gefunden haben. Würden wir aber diesen Fall als Ausnahme hinnehmen, so würden wir sofort eine zweite noch bedenklichere Annahme hinzufügen müssen: daß der Mechanismus der Zymohexasewirkung im Muskel und in Hefe verschieden ist. Denn einen Nichtproteinteil der Hefe-Zymohexase haben wir gefunden. Hefe-Zymohexase ist kein Protein, sondern ein dissociierendes Schwermetallproteid.

XIII. Hefe-Zymohexase[5]

Hefe-Zymohexase wurde nach einer 1942 veröffentlichten Vorschrift vorgereinigt. Zur weiteren Reinigung adsorbierten wir das Ferment bei pH 6,5 an Aluminiumhydroxyd, eluierten das Aluminiumhydroxyd mit viel Wasser, wobei das Ferment adsorbiert blieb und eluierten dann das Ferment mit m/50 Pyrophosphat bei pH

7,1. Es folgte Verdünnung des Eluats auf m/100 Pyrophosphat, Ansäuren mit Essigsäure bis pH 4,9, wobei ein unwirksamer Niederschlag fiel, und Fällen des Ferments mit $^1/_3$ Volumen Alkohol. Der Ferment-Niederschlag wurde dann in wenig Wasser suspendiert, mit Natronlauge neutralisiert und in gefrorenem Zustand zu einem haltbaren Pulver getrocknet.

Die so gewonnene Hefe-Zymohexase hatte, in Test 1 geprüft, etwa die gleiche Wirksamkeit, wie die kristallisierte Muskel-Zymohexase. Doch kristallisierte diese Hefe-Zymohexase nicht* und so können wir über ihren Reinheitsgrad keine Angaben machen.

Mißt man die Wirkung so gereinigter Hefe-Zymohexase im optischen Test 1 unter Zusatz von Cystein, so findet man starke Hemmung. Da auch andere Komplexbildner wie Dipyridyl, Phenanthrolin und Pyrophosphat hemmen, so muß die Hefe-Zymohexase eine dissociierende Schwermetallverbindung sein.

Dies kann man beweisen, indem man zu dem durch Cystein gehemmten Ferment Schwermetallsalze zusetzt, wenig im Vergleich zu dem Cystein, aber genug, um das Ferment-Protein mit Metall zu sättigen. Dann findet man, daß 3 Metalle die Wirkung des Ferments wiederherstellen können: Zink-, Ferro- und Kobalto-Salze.

Auf die Reaktivierung des Ferments durch Zink hat Sauerstoff keinen Einfluß. Die Reaktivierung durch Eisen jedoch ist vom Sauerstoffdruck abhängig; sie ist am größten bei Abschluß von Sauerstoff und sehr gering bei Sättigung der Testlösungen mit Sauerstoff von Atmosphärendruck. Die Erklärung ist, daß nur das zweiwertige Eisen reaktivieren kann. In einer Cysteinlösung, die wenig Eisen enthält, ist das gesamte Eisen bei Abschluß von Sauerstoff zweiwertig und bei Sättigung mit Sauerstoff von Atmosphärendruck ist fast das gesamte Eisen dreiwertig.

Wenn nun von den beiden Oxydationsstufen des Eisens nur das zweiwertige Eisen die Zymohexase aktiviert, und wenn Eisen in Cysteinlösungen bei Abschluß und Zufuhr von Sauerstoff seine Valenz wechselt, so kann man hier wie in lebenden Zellen, aber hier durch einen chemisch klaren Mechanismus, Spaltung von Zucker entstehen lassen oder zum Verschwinden bringen, indem man Sauerstoff abschließt oder zuführt.

Ist damit der Schlüssel zu der Pasteurreaktion gefunden, jener Reaktion, durch die in lebenden Zellen die Sauerstoffatmung die Gärung hemmt? Zwar könnte es im Leben nicht der molekulare Sauerstoff sein, der die aktive Ferro-Zymohexase zu der inaktiven Ferri-Zymohexase oxydierte; aber es würde zu allem, was über die Pasteurreaktion bekannt ist, stimmen, wenn das Eisen des sauerstoffübertragenden Ferments durch die Reaktion

$$\text{Ferri-Oxygenase} + \text{Ferro-Zymohexase} \rightleftarrows \text{Ferro-Oxygenase} + \text{Ferri-Zymohexase}$$

die Zymohexase inaktivierte.

Wie die Pasteurreaktion wäre diese Reaktion in weiten Grenzen vom Druck des Sauerstoffs unabhängig, weil die Konzentration der Ferri-Oxygenase in weiten

---

* *Zusatz 1961.* Die Hefezymohexase ist inzwischen kristallisiert worden. Siehe Arbeit 21 dieses Buchs.

Grenzen vom Sauerstoffdruck unabhängig ist. Wie die Pasteurreaktion würde diese Reaktion durch Kohlenoxyd und durch Blausäure gehemmt, weil die Konzentration der Ferri-Oxygenase durch Kohlenoxyd und Blausäure vermindert wird. Wie die Pasteurreaktion könnte diese Reaktion, ohne gleichzeitige Atmungshemmung, durch Carbylamin gehemmt werden, wenn Carbylamin durch Anlagerung an das Ferro-Eisen der Zymohexase die Ferro-Zymohexase vor der Oxydation schützte.

Trotzdem nun auf die angedeutete Weise vieles, was bisher chemisch unverständlich war, erklärt werden könnte, so muß doch zunächst abgewartet werden, wie das Problem der Muskel-Zymohexase gelöst werden wird. Denn ebenso wie in Hefe gibt es im Muskel eine Pasteurreaktion und keine Erklärung kann befriedigen, die die Pasteurreaktion nicht einheitlich, unabhängig von der Zellart erklärt.

Wahrscheinlich wird man hier am schnellsten durch eine Untersuchung der Hefe-Zymohexase zum Ziel kommen, also die negative Frage beiseite lassen, warum die Muskel-Zymohexase durch Schwermetalle nicht aktiviert wird und statt dessen die positivere Frage untersuchen, warum die Hefe-Zymohexase durch Schwermetalle aktiviert wird. Da Zink zu den aktivierenden Metallen gehört, kann die Wirkung der Schwermetalle hier nicht wie in den sauerstoffübertragenden Fermenten auf einem Valenzwechsel beruhen. Offenbar liegt hier ein anderer Mechanismus biologischer Schwermetallwirkungen vor.*

XIV. Kristallisation der Proteine der beiden dephosphorylierenden Fermente[7a]

Das Protein des ersten dephosphorylierenden Ferments ist unter meiner Leitung von Th. Bücher mit Hilfe des Tests 4 aus Hefe isoliert und aus Ammonsulfat unter Zusatz von Pyrophosphat kristallisiert worden. Die Methode der Isolierung bestand im wesentlichen aus einer Fraktionierung der Zellproteine als Nukleoproteide mit Säure; neu war dabei, daß unter Zusatz von Alkohol fraktioniert wurde.

Das Protein zeichnet sich vor andern Ferment-Proteinen der Gärung durch seine große Wirksamkeit aus. Im optischen Test genügt eine Protein-Konzentration von 0,01 γ pro cm^3. Rechnen wir mit einem Molekulargewicht von 100000, so beträgt die molare Wirksamkeit in der Richtung der Gärung bei 25°:

$$W_{molar} = 320000 \text{ [Mole Substrat / Mole Ferment} \times \text{Minuten]}.$$

Das Protein des zweiten dephosphorylierenden Ferments ist mit Hilfe des Tests 7 aus Hefe isoliert und aus Ammonsulfat kristallisiert worden. An Einzelheiten des Isolierungsverfahrens, das Negelein ausgearbeitet hat, kann ich mich nicht mehr erinnern.

Die Proteine der beiden dephosphorylierenden Fermente sind streng spezifisch

---

* *Zusatz 1961.* Inzwischen ist diese Schwermetallwirkung zweiter Art, wie wir sie nennen wollen, sehr häufig in Fermenten gefunden worden, ohne daß eine Erklärung für den Mechanismus der Metallwirkungen gefunden worden wäre.

für ihre Teste, können sich also in ihren Testen nicht vertreten. Es ist weiterhin eine Folge der strengen Spezifizität, daß die beiden Teste nach Zusatz ihrer spezifischen Proteine reaktionslos bleiben, wenn man statt der stöchiometrischen Mengen katalytische Mengen Adenosindiphosphat zusetzt und außerdem viel Hexose oder Hexosemonophosphat. Es geht daraus hervor, daß die Dephosphorylierung und die Phosphorylierung der Substrate an verschiedenen Proteinen vor sich geht; daß also die phosphatübertragenden Fermente, ebenso wie die wasserstoffübertragenden Fermente, aus je 2 Proteinen mit gemeinsamer prosthetischer Gruppe bestehen. Dies ist schon in Kapitel III hervorgehoben, aber dort nicht experimentell begründet worden.

Im ganzen gibt es in gärenden Zellen 4 an der Phosphatübertragung beteiligte spezifische Proteine, von denen jedes mit Adenosinpolyphosphat und Magnesiumsalz zu Proteinen zusammentritt, die ich in Analogie zu den Alloxazin- oder Pyridin-Proteiden als „Adenosin-Proteide" bezeichnen möchte.

Die 4 Adenosin-Proteide, die also thermodynamisch betrachtet nicht Fermente, sondern Halb-Fermente sind, kann man paarweise zu 4 phosphatübertragenden Fermenten folgender Funktionen zusammensetzen:

1. Ferment, das Phosphat von der 1-Stellung der 1,3-Diphosphoglycerinsäure auf Hexose überträgt.
2. Ferment, das Phosphat von der 1-Stellung der 1,3-Diphosphoglycerinsäure auf Hexosemonophosphat überträgt.
3. Ferment, das Phosphat von der Phosphobrenztraubensäure auf Hexose überträgt.
4. Ferment, das Phosphat von der Phosphobrenztraubensäure auf Hexosemonophosphat überträgt.

XV. Kristallisation des Proteins des reduzierenden Gärungsferments aus Tumoren[9]

Wenn das Protoplasma der Zellen der Inbegriff ihrer Fermente ist, dann sollte man annehmen, daß die Fermente gleicher Funktion verschiedener Organe eines Tieres verschieden sind. Da die prosthetischen Gruppen gleich sind, so wird man die Verschiedenheiten in den Proteinkomponenten suchen müssen. Man wird also beispielsweise erwarten, daß die Proteine der reduzierenden Gärungsfermente von Muskeln und Leberzellen derselben Tierart verschieden sind.

Wir haben die Untersuchung dieses wichtigen Problems in unsystematischer Weise mit einem Vergleich von Muskel- und Tumorfermenten begonnen. Das Versuchstier war die Ratte, der Tumorstamm war das Jensensarkom, die Fermente waren die reduzierenden Gärungsfermente, deren Proteine unter meiner Leitung von Kubowitz und Ott aus Muskeln und aus Tumoren isoliert und als Quecksilbersalze kristallisiert wurden.

Wir haben keine Unterschiede der Kristallform, der elementaren Zusammensetzung, des Ultraviolettspektrums und der Drehung der Polarisationsebene ge-

funden, die wir als außerhalb der Fehlergrenzen betrachten könnten. Bei der Größe des Proteinmoleküls mag dies nicht viel bedeuten.

Wir haben identische Zerstörungskurven beim Erhitzen in neutraler wäßriger Lösung, beim Bestrahlen mit 303 und 334 mμ und beim Abbau durch Dünndarmsekret erhalten.

Wir haben die gleichen Konstanten der Dissociation der Fermente in Protein und prosthetische Gruppe gefunden, nämlich $K = 5 \cdot 10^{-6}$ Mole/Liter bei neutraler Reaktion und 20^0.

Für die bemerkenswerteste Übereinstimmung der beiden Fermente aber halte ich, daß ihre chemischen Wirksamkeiten numerisch gleich gefunden wurden. Die molaren Wirksamkeiten in Richtung der Gärung, berechnet mit einem Molekulargewicht* von 100000, betrugen bei Variation der äußeren Bedingungen:

	Muskelferment W_{molar}	Tumorferment W_{molar}
20^0 pH 8,15	30 000	31 000
39^0 pH 8,16	46 000	45 000
20^0 pH 7,36	23 000	23 000
39^0 pH 7,38	73 000	73 000

XVI. Gärungsfermente im Blut von Tumortieren[13]**

Wenn bei der Entwicklung der Tumoren im Körper ein humoraler Faktor beteiligt ist, so sollte sich das Serum von Tumortieren von dem Serum normaler Tiere unterscheiden. Wegen der Gärung der Tumoren haben wir an Gärungsfermente gedacht und haben mit den optischen Testen im Serum von Tumortieren Gärungsfermente gesucht. Zum Vergleich dienten normale Tiere und gravide Tiere.

Gibt man 0,1 bis 0,2 cm^3 Serum oder Plasma zu den 3 cm^3 Testlösung, die wir für unsern Quarztrog brauchen, so kann man die meisten der 11 Fermente der Milchsäuregärung in Normalserum, in Gravidenserum und in Tumorserum von Ratten nachweisen. Zwei dieser Fermente waren in Serum von Tumorratten vermehrt: die Zymohexase und die Isomerase.

Die Tumoren waren Jensensarkome oder Walker-Carcinome, die unter die Haut oder in das Abdomen geimpft worden waren. Waren die Tumoren groß, so betrug der Gehalt an Zymohexase und Isomerase das 10- bis 20fache des Normalwerts.

An eine klinische Anwendung als „Krebsreaktion" ist wegen der erforderlichen Größe der Tumoren nicht zu denken. Theoretisch aber ist die Erscheinung interessant. Stammt die Zymohexase im Serum der Tumortiere, was am nächstliegenden wäre, aus zerfallenen Tumorzellen? Oder bewirken die Tumoren, daß normale

* Bücher fand mit der Streulichtmethode für beide Proteine 90000.

** *Zusatz 1961.* Ausgehend von dieser Arbeit hat sich in den letzten Jahren eine klinische Enzymologie des Blutserums entwickelt.

Körperzellen Gärungsfermente an den Kreislauf angeben? Und können Tumorzellen solche Gärungsfermente in ihr Protoplasma einbauen? Dann würde man das Wachstum der Tumoren im Körper und ihren parasitischen Charakter besser verstehen; und man würde auch verstehen, warum die Gewebekultur keine Auskunft über das Verhalten der Tumorzellen im Körper gibt.*

Literatur

1 Engelhardt, W. A., The Yale J. of Biol. a. Med. 15 (1942), Nr. 1.
2 Biochem. Z. 286 (1936), 81.
3 Bioch. Z. 310 (1941), 384.
4 Biochem. Z. 303 (1939), 231.
5 Biochem. Z. 314 (1943), 149.
6 Biochem. Z. 314 (1943), 149.
7 Biochem. Z. 303 (1939), 40.
7a Biochimica et Biophysica 1 (1947), 292.
8 Biochem. Z. 310 (1941), 384.
9 Biochem. Z. 314 (1943), 94.
10 Biochem. Z. 159 (1925), 58.
11 Biochem. Z. 303 (1939), 132.
12 Harden, A., und Young, W. J., Proc. Chem. Soc. 21 (1905), 189; Proc. Roy. Soc. B. 80 (1908), 299.
13 Biochem. Z. 314 (1943), 399.

* *Zusatz 1961.* Antwort in Arbeit 22 dieses Buchs.

3 Über den Quantenbedarf der Kohlensäureassimilation.*

Von Otto Warburg

Nach Robert Emerson, James Franck und Hans Gaffron[1] wird die photochemische Reduktion der Kohlensäure in grünen Pflanzenzellen durch einen photochemischen „Ausstoß" von Kohlensäure eingeleitet. Belichtet man also vorher verdunkelte grüne Zellen in Gegenwart von Kohlensäure, so soll in den ersten Belichtungsminuten keine Kohlensäure von den Zellen absorbiert, sondern umgekehrt Kohlensäure aus den Zellen entwickelt werden. Da mich die Versuche nicht überzeugten und mir das Ergebnis unwahrscheinlich erschien, habe ich eine Methode ausgearbeitet, um den assimilatorischen Quotienten

$$\gamma = \frac{\text{Kohlensäure absorbiert}}{\text{Sauerstoff entwickelt}}$$

für Zeitintervalle von einigen Minuten zu bestimmen.

Das Prinzip der manometrischen Methode ist in der Fig. 1 angedeutet. Chlorella, suspendiert in Knopscher Lösung und gesättigt mit 10 Vol. % CO_2 in O_2, wurde hintereinander in demselben Gefäß in wenig und in viel Flüssigkeit belichtet, wobei die Intensität des Lichts konstant und die Absorption des Lichts vollständig

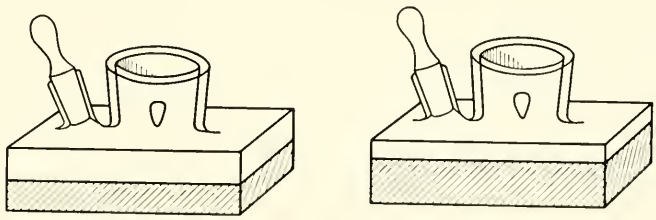


Fig. 1. Manometergefäß von etwa 15 ccm Gesamtvolumen. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 5 ccm oder 8 ccm, während die Zellmenge konstant bleibt. Belichtet wird mit rotem Licht des Bezirks 635 bis 675 mμ.

war. Waren die Flüssigkeitsvolumina verschieden, so waren auch die Druckänderungen verschieden und aus dieser Verschiedenheit konnte der assimilatorische Quotient γ — für Zeitintervalle von 3 bis 5 Minuten — berechnet werden.

---

* Aus: Die Naturwissenschaften 33 (1946): 122.

Zusatz 1961. Bei einem Besuch in Emersons Laboratorium in Urbana/Illinois im Jahr 1948 war Emerson nicht imstande, trotz eines Aufenthaltes von mehreren Monaten, mir den Ausstoß der Kohlensäure durch ein Experiment zu zeigen. Der Ausstoß der Kohlensäure bei den früheren Experimenten Emersons war vorgetäuscht worden durch zu langsames Schütteln der beiden Gefäße bei der 2-Gefäß-Methode. Das erste Erfordernis dieser Methode, Konstanz der manometrischen Ausschläge bei Vermehrung der Schüttelgeschwindigkeit, war von Emerson nicht beachtet worden.

Ich fand $\gamma = 0{,}95$, sowohl in den ersten Belichtungsminuten nach längerer Verdunkelung, als auch bei fortgesetzter Belichtung. Es wurde also zu keiner Zeit Kohlensäure aus den Zellen photochemisch entwickelt; sondern es wurde, dem Sinn der Kohlensäureassimilation entsprechend, immer Kohlensäure absorbiert und etwa das gleiche Volumen Sauerstoff entwickelt.

Wäre es wahr gewesen, daß die photochemische Reduktion der Kohlensäure mit einem Ausstoß von Kohlensäure anfängt, so wären die meisten neuzeitlichen Assimilationsmessungen falsch gewesen und es wäre vor allem der Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation falsch berechnet worden. So aber bleibt es dabei, daß von dem Chlorophyll der grünen Pflanzen 4 Lichtquanten (gleichgültig welcher Wellenlänge) absorbiert werden müssen, damit 1 Molekül Kohlensäure unter Entwicklung von Sauerstoff reduziert wird:

$$CO_2 + H_2O + 4\,h \cdot \nu = CH_2O + O_2.$$

In der ausführlichen Arbeit wird außer der Methode der γ-Bestimmung auch eine neue und wesentlich vereinfachte Methode zur Bestimmung des Energieumsatzes beschrieben werden.

Literatur

1 Emerson, R., und Lewis, Ch. M., Amer. Journ. of Botany 26 (1939), 808. James Franck und Hans Gaffron, Advances in Enzymology 1 (1941), 199.

2 Warburg, O., und Negelein, E., Z. f. physikalische Chem. 106 (1923), 191.

4 A Manometric Actinometer for the Visible Spectrum*

Otto Warburg and Victor Schocken

The actinometer to be described in this paper is based upon the work of H. v. Tappeiner[1], who discovered the sensitization of photooxidation processes by dyes; upon that of S. E. Sheppard[2], who discovered the role of sulfur compounds, especially of allyl thiourea, in the photochemical process of photography; and upon the manometric and bolometric method developed at Dahlem for the measurement of the quantum yield of photosynthesis[3a, b]. In 1926, Warburg and Gaffron[4] determined the quantum yield of photooxidation of allyl thiourea when sensitized by chlorophyll or porphyrin by these methods. The result was that 1 molecule of oxygen reacts, if 1 light-quantum is absorbed by the sensitizers, that means that the quantum yield was

$$\varphi = \frac{O_2}{h \cdot \nu} = 1.$$

Due to many circumstances, the technical procedure of 1926 was too complicated to be used for practical actinometric purposes. We have simplified the procedure in such a way that quantum intensities can now be measured in the greater part of the visible spectrum by the chemical process of photooxidation wherever simple manometrie equipment is available. We replaced the differential manometer by the simple Haldane-Barcroft manometer; Acetone, which because of its high vapor pressure, is unsuitable for manometric experiments, was replaced by pyridine, which, thus far, is the most appropriate solvent we have found. Allyl thiourea was replaced by unsubstituted thiourea, a simplification by which we eliminated a slow dark reaction.

We have tried many substances as reductants in our system but none equaled thiourea. Even substances such as hydroquinone, which are easily oxidized by many oxidants, could not be photooxidized at all. Thus, Sheppard's discovery of the specific reactivity of certain sulfur compounds proved as important in photooxidation as in photography.

We have tried many dyestuffs but none equaled chlorophyll or prophyrin as sensitizers. We used crystalline ethyl chlorophyllid and crystalline protoporphyrin. As light absorbers they are complementary, the chlorophyll transmitting the green and the protoporphyrin transmitting the red. If mixed together they absorb the greater part of the visible spectrum.

Photooxidation of Thiourea

One mg. of thiourea (13.2 micromoles) was dissolved in 5 cc. of pyridine. One-tenth mg. of protoporphyrin was added. The mixture was introduced into a rectangular vessel of 14 cc. volume which was connected to a manometer. The gas space contained air. When shaken in the thermostat at 20°C. and illuminated with a 200 w. incandescent lamp at 20 cm., 135 mm.^{3} O_2 were absorbed

* Aus Archives of Biochemistry 21 (1949): 363.

during the first 10 min. When, after 230 min., the oxygen uptake had become very slow, 735 mm.^{3} O_2 had been absorbed, that is, 2.5 moles O_2/mole of thiourea. Only 2 moles of oxygen are calculated when the thiourea is oxidized according to the equation:

$$CS\begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix} + 2\,O_2 = CNNH_2 + H_2SO_4 .$$

(Cyanamide)

The pyridine solution was evaporated *in vacuo*, the residue taken up in water, and the insoluble porphyrin removed by filtration. In the filtrate, about 74% of the calculated amount of H_2SO_4 was precipitated by $BaCl_2$. To another portion of the solution $AgNO_3$ and ammonia, or copper acetate and ammonia, were added to test for cyanamide. Silver produced a dark yellow precipitate and copper a black precipitate. Another portion of the solution was tested for urea by urease, which was added from the sidearm of a manometer vessel to the acidified solution (pH 5.5). Seventeen per cent of the thiourea was recovered as urea. This urea may have been formed by hydrolysis of cyanamide:

$$CNNH_2 + H_2O = CO\begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix}$$

Finally, it may be mentioned that the proporphyrin is slowly photooxidized in the solution Spectroscopic examination showed the appearence of a band in the red at about 675 mμ. Very probably this is the first step in the transformation of blood pigment to bile pigment discovered in 1930[5].

Actinometer

Two hundred mg. of thiourea, dissolved in 5 cc. pyridine ("medicinal" grade, Mallinckrodt), are introduced into a rectangular vessel of about 14 cc. volume. Two mg. of crystalline ethyl chlorophyllid are added, if red, yellow, or blue light is to be measured. Ten mg. of crystalline protoporphyrin are added if green or blue light is to be measured.

The vessel is then connected to a simple manometer of the type used for respiration measurements. Pure oxygen is introduced into the gas-space. The vessel is shaken in the thermostat at 20°C. in the dark, until the pressure remains constant for at least 15 min. If the vessel then is illuminated by light which is absorbed by the chlorophyll or the porphyrin, thiourea is oxidized and the oxygen pressure in the vessel decreases.

It is an essential feature of this arrangement that the concentration of the chlorophyll or the porphyrin is so high that light entering in a vertical direction through the bottom of the vessel is completely absorbed, even when the vessel is in motion. To test this condition it must be shown that the oxygen consumption remains constant if the concentration of the dyes is increased.

Quantum Yield

The light beam leaving the slit of a monochromator was collimated by lenses and reflected by a mirror vertically into the vessel. The cross-section of the beam

entering the vessel was about 2 cm.^{2}, whereas the bottom area of the vessel was about 9 cm^2. The light beam was adjusted to the middle of the vessel. Thus, when the vessel was shaken, no part of the beam passed outside the vessel.

The total intensity of the light beam was measured bolometrically as described elsewhere[5]. The bolometer had been calibrated against a standard lamp of the U. S. Bureau of Standards. The quartz window, which protected the strips of the bolometer, was 2 mm. thick and transmitted 82.5% of the radiation of the standard lamp.

The actinometer was shaken in the ordinary shaking-machine[3a] with horizontal (not circular) motion. Foaming never occurred. When equilibrium was reached in the thermostat in the dark at 20^{0}C., the pressure was noted. The manometer was then taken out of the thermostat and the shaking continued in air at about 20^{0}C. Here the actinometer was illuminated with light of measured intensity. After periods of 10—30 min., the illumination was interrupted, the manometer was again placed in the thermostat and, after shaking 5 min. in the dark, the pressure was read.

The purpose of this procedure was to avoid uncertain corrections for the light transmission of the windows of the thermostat and of the water in the thermostat. The same mirror which reflected the light beam in a vertical direction into the actinometer, by rotation could reflect the same light beam into the bolometer. If I was the total intensity of the beam which reached the strips of the bolometer, $1.04 \cdot I$ was the total intensity which entered the actinometer. Thus, the corrections for the different paths of the light were reduced to a minimum.

We have tried to determine whether shaking is necessary during illumination, and always found distinctly smaller quantum yields when resting vessels were illuminated. The layer of the solution in which the main part of the light is absorbed is very thin and it seems that here, in the resting vessels, concentrations decrease to such a degree that light energy is lost.

Here follows an example of determination of the quantum yield:

20^{0}C.; 100% O_2; 585—615 mμ (600 mμ).

$V = 14.10$ cm.^{3} $v_F = 5$ cc. $v_G = 9.10$ cc. $K_{O_2} = 0.893$.

200 mg. thiourea. 2 mg. ethyl-chlorophyllid, dissolved in pyridine. The solubility of O_2 at 20^{0}C. in the actinometer solution was determined manometrically. $\alpha = 0.092$ was found and used for the calculation of the vessel-constant $K_{O_2} = \dfrac{v_G \dfrac{273}{T} + v_F \cdot \alpha}{10}$ (mm.^{2}). The total light intensity entering the vessel was $I = 0.109$ micromoles of quanta/min. The manometer readings were:

20 min. dark	0
15 min. light 5 min. dark	—39 mm.

$$= -34.8 \text{ mm.}^3 = \frac{34.8}{22.4} = 1.55 \text{ micromoles } O_2.$$

$$\varphi = \frac{1.55}{15 \times 0.109} = \frac{1.55}{1.64} = 0.945.$$

In the following table are presented the results of a continuous series of experiments, the time of illumination being 30 min. in the blue or 15 min. in the other spectral regions. In each of the four spectral regions mentioned in the table, the light was tested for unabsorbed light, especially for infrared. Between the exit slit of the monochromator and the bolometer we placed an absorption cell of 1 cm. thickness. When the cell contained acetone or pyridine, it transmitted 91% of the

light, the loss being effected only by reflection. When 0.2 mg. of ethyl-chlorophyllid per cc. of acetone were added, the transmission in the blue, the yellow or the red was nearly zero; when 1 mg. of protoporphyrin per cc. of the pyridine was added, the transmission in the green was nearly zero.

It follows, from the data recorded in the table, that the accuracy of the method is sufficient for most photochemical experiments, inorganic or biological. The light intensities mentioned in the table should not be exceeded. One micromole of quanta entering the vessel in a period of 15 min., is about the right intensity. The pressure changes then are about 20 mm. and can be read with an accuracy of 5%.

Wavelength ($m\mu$)	Light absorbed (micromoles quanta)	Oxygen consumed (micromoles O_2)	$\varphi = \frac{\text{micromoles } O_2}{\text{micromoles quanta}}$
640—660 (red)	1.98	1.82	0.92
640—660 (red)	0.99	1.02	1.03
505—525 (green)	1.14	1.10	0.96
420—450 (blue)	0.36	0.42	1.16
585—615 (yellow)	1.90	1.79	0.94
585—615 (yellow)	0.95	0.96	1.01
420—450 (blue)	0.44	0.46	1.04
640—660 (red)	1.65	1.47	0.89
640—660 (red)	0.825	0.78	0.94
640—660 (red)	0.83	0.83	1.00
585—615 (yellow)	1.64	1.55	0.95
505—525 (green)	0.88	0.84	0.95
		Average =	0.98

We started our experiments with dioxane as solvent. If it was pure and free of peroxide, the quantum yield seemed to be one. Otherwise, the yield was greater and could be decreased by cyanide or increased by copper salts. When peroxide-free dioxane, was kept overnight in a bottle which was not airtight it gave a strong peroxide reaction with KJ. Therefore, dioxane was discarded as a solvent. Thus far we have not found a more satisfactory solvent than pyridine, which has a sufficiently low vapor pressure and dissolves thiourea, ethyl chlorphyllid and protoporphyrin sufficiently.

Applications

The actinometer seems particularly suitable for determinations of the quantum yield in photosynthesis. We first place the actinometer in the path of a light beam whose intensity is unknown and measure the oxygen uptake. In the same position we then place a vessel of the same dimensions filled with living green cells which also absorb the light completely. If we compare equal periods of irradiation, we obtain the quantum yield of photosynthesis by the simple equation:

$$\varphi = \frac{O_2 \text{ developed}}{O_2 \text{ absorbed}} = \frac{O_2}{h\nu}.$$

The general usefulness of the actinometer becomes apparent if we bear in mind that the instrument integrates the light intensities over time and number of quanta.

If, for example, the vessel is shaken in light whose intensity and spectral distribution change with time, then one single manometric reading taken at the end of a given period gives the number of quanta which have entered the vessel during the whole period.

There is one limitation of the instrument: *i.e.*, that the light entering the vessel must be completely absorbed. Under the conditions given above, the instrument can be used from 670 mμ in the red to the blue end of the visible spectrum. How far it can be used in the ultraviolet must still be investigated. Quartz vessels must be used instead of glass vessels.

Direct Photooxidation of Thiourea

Two hundred mg of thiourea, dissolved in 5 cc. pyridine, were introduced into the rectangular glass vessel and illuminated—without addition of chlorophyll or porphyrin—by a 100 w. mercury vapor lamp in a "black glass" envelope, at about 15 cm. distance. In 45 min., 24 mm.^{3} O_2 were taken up.

Summary

A chemical actinometer has been described, by which quantum intensities in the greater part of the visible spectrum can be measured manometrically.

References

1 Tappeiner, H. v., Ergeb. Physiol. 8 (1909), 698.
2 Sheppard, S. E., Phot. J. 65 (1925), 380.
3a Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.
3b Warburg, O., and Negelein, E., Z. physik. Chem. 102 (1922), 236; 106 (1923), 191.
4 Gaffron, H., Chem. Ber. 60 (1927), 755.
5 Warburg, O., and Negelein, E., Chem. Ber. 63 (1930), 1816; Lemberg, R., Biochem. J. 29 (1935), 1322; Stier, E., Z. physiol. Chem. 275 (1942), 155.

5 The Quantum Efficiency of Photosynthesis*

By Otto Warburg, Dean Burk, Victor Schocken
and Sterling B. Hendricks

Photosynthesis is a unique endothermic photochemical reaction in which chemical energy is gained from visible light energy by the combined action of several quanta. Nothing similar is known in the nonliving world. It was first reported a quarter of a century ago[1] that in photosynthesis the greater part of the absorbed visible light energy could be converted into chemical energy under optimum conditions. Indeed, no more than four quanta of red light seemed to be necessary to produce one molecule of oxygen gas, which is close to the thermodynamic requirement of three quanta. It is easy to understand that this result, lacking any analogy, has sometimes been doubted by theoreticians, and it is a fact that certain investigators have raised methodological objections[2]. For this reason we have reinvestigated the question of the minimum quantum requirement of photosynthesis as measured by oxygen and carbon dioxide gas exchange. The present paper is a short summary of our findings by new and simplified methods.

I. Cultivation of Cells

A strain of *Chlorella pyrenoidosa*, isolated in New England and identified by Dr. Florence Meier of the Smithsonian Institution, and for many years in laboratory use, was cultivated in tall Drechsel gas washing bottles containing 200 ml of the following salt solution: 5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2.5 g KNO_3, 2.5 g KH_2PO_4, 2 g NaCI, and 5 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, in 1 liter of filtered, unsterilized well water (pH 4.5—5). The cultures were maintained at a room temperature of 25—30° C, and were aerated with 5% CO_2 in air at a rate (~500 ml per minute) rapid enough to prevent cell settling, and were constantly illuminated with a 100-watt incandescent lamp at a distance of about 30 cm. Cells cultivated by this method gave more uniform material and more regular manometric results than when cultivated by the older method (1, p. 427) in which slowly aerated cells settled down in Erlenmeyer-shaped flasks and became partially anaerobic until reshaken up, and in which lowered light intensities were employed for the terminal cultivation phase.

The cultures were used for the experiments in the present work after 2—10 days growth, when they contained 200—1000 μl cells, depending upon the amount of initial inoculation. Usually 50—100 μl cells per 200 ml medium were employed as inoculum, grown as just indicated. Bacterial growth during either cell culturing or manometric experiments was found with a haemocytometer to be negligible, due to the low pH, the lack of added organic matter in the synthetic medium, and possible antibiotics produced by the *Chlorella*.

The cells for experimental use were centrifuged in an International No. 2 Centri-

* Aus Biochimica et Biophysica Acta 4 (1950): 335.

fuge at the lowest possible speed giving nearly complete settling in 10 minutes and were taken up, with or without further washing, in fresh nutrient medium at a concentration of 30—50 μl cells per ml.

II. Monochromator

A Steinheil glass 3-prism spectrograph operated with a focal lenght of 195 mm at F 3.5 for the collimator and a focal length of 710 mm for the telescope was used as a monochromator. The slit was illuminated with a 750-watt projection lamp. The image of the coiled filament at about 20^0 to its plane was projected onto the slit with an auxiliary lens. A 1000-watt voltage regulator was used to supply power to the lamp which operated at constant current.

The width of the entrance slit was about 2 mm, corresponding to about 20 mμ in the red. A slit was placed in the focal plane of the telescope and was adjusted to have a width of about 30 mμ covering the region 630 to 660 mμ. A lens was placed behind this slit to throw, in a weakly convergent beam, an image of the exit prism face on the bottom of the manometer vessel.

The area of the beam at the vessel was about 3 cm^2 and the energy flux was about 0.6 microeinsteins/min. This intensity was decreased when desired by placing in the light beam, just before the exit slit, blackened wire screens calibrated by the National Bureau of Standards.

III. Measurement of Light Energy

The energy of the light beam was measured by the recently developed chemical actinometer[3] whereby for each quantum of visible light absorbed one molecule of O_2 is consumed. In the same or similar rectangular vessel as used for the yield determinations were placed 2 mg ethyl chlorophyllide, 200 mg thiourea, 7 ml pyridine, and O_2 gas. The actinometer vessel was shaken in the thermostat at 20^0C in the same manner and in the same cross-section of the light beam as the vessels with the cell suspensions were shaken during the yield determination. The total intensity of light, absorbed by the actinometer, should not exceed 0.3 microeinsteins per minute under our working conditions. Higher intensities, as used for the yield determinations, were diminished for this purpose by the calibrated screens. Several 10 minute periods were observed for every actinometer determination. When in t minutes the pressure change in the actinometer vessel is h_{O_2} mm, the total energy flux in the light beam in t minutes is $\frac{h_{O_2} \cdot k_{O_2}}{22.4}$ or $\frac{x_{O_2}}{22.4}$ microeinsteins (micromole quanta), where the vessel constant k_{O_2} is expressed in mm^2. Then, when the oxygen developed by illuminating the green algae is n μl and the oxygen absorbed in the actinometer for the same time and beam of light is n' μl, the quantum requirement per mol of O_2 developed in photosynthesis is simply $1/q = n'/n$.

IV. Comments on the 2-Vessel Manometric Method

If the yield φ and the assimilatory quotient, $\gamma = \frac{-CO_2}{+O_2}$, are to be determined simultaneously, two vessels must be employed. If H be the pressure change in vessel I and H′ that in vessel II, the x_{O_2} and x_{CO_2} values can be calculated by well known equations (see [1] and section 8).

The 2-vessel method, simple when the gas-exchanges in the dark are determined, requires special attention when applied to illuminated cells. As will be shown later, the illumination of the cells is an illumination with intermittent light. This intermittency should be equal in the two vessels, and this is attainable if the liquid volumes are equal in both vessels. Furthermore, the respiration in most cell suspensions gradually changes with time, so that the pressure changes in light will also change with time. Thus the two vessels should be darkened and illuminated simultaneously so that the conditions of the aforementioned equations are fulfilled, namely

$$x_{O_2} = x'_{O_2}$$
$$x_{CO_2} = x'_{CO_2}$$

where the primed magnitudes refer to one vessel and the non-primed to the other.

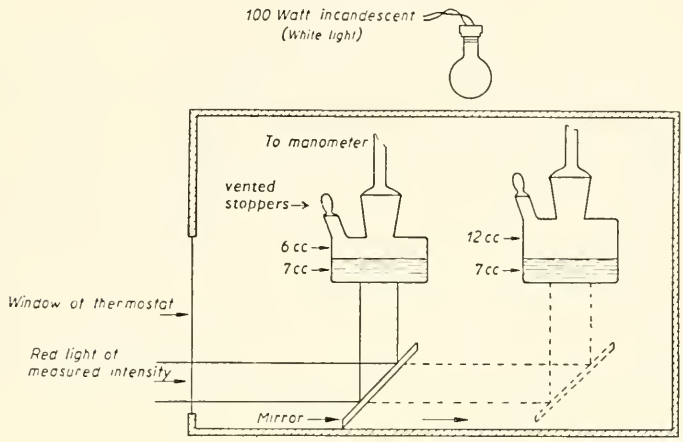
These conditions may be satisfactorily met by the method of alternately shifting the mirror under the two vessels at periods of, *e.g.*, 10 minutes, as indicated in Fig. 1, and discussed in the next section. After two or more cycles, the pressure readings for each vessel for light and dark periods may be averaged and the light action calculated from the differences between the pressure changes in light and dark. A possible error involving noncomparability of time periods is thus eliminated. This error has been one of the main sources of difficulty in *Chlorella*-photosynthesis experiments with the 2-vessel method.

V. Procedure

Simple HALDANE-BARCROFT constant-volume manometers with small capillaries (0.8 mm diameter) with rectangular vessels attached were shaken horizontally (not by arc motion) at 140—180 (usually 150) cycles per minute at an amplitude of 2.0 cm in a water bath at 20°C. The two rectangular vessels of about 2.2 × 3.8 cm inside width and length and 13—14 and 18—19 ml volume respectively, were filled with 200—400 μl cells in 7 ml, thus the liquid volumes were identical and the gas spaces differed. The vessels (with capillary sidearm vents) were gassed on the bath, simultaneously with aid of a manifold, and with shaking. The horizontal (not arc) shaking was so effective that physical after-effects of gas equilibration in the transition periods of dark to light and vice versa were not appreciable even when the illumination produced photosynthesis far above the compensation point and pressure changes of 5—10 mm per minute were involved. The manometers were usually read without stopping. The end of the manometer male joint was not flat rough but concave and polished, so that bubble formation in the cappillary did not occur; nor did foaming.

As indicated in Fig. 1 a beam of red light (630—660 mμ) of about 3—4 cm² area,

produced by means of the Steinheil monochromator, entered the side of the thermostat through a two walled window and was reflected by a mirror onto the bottom of a vessel, alternately in the one or the other by either shifting the mirror or the manometers, depending on the design of the experiment. The red light entering the vessel was completely absorbed. To accomplish this, the amount of cells must be sufficiently great. The amount depends upon the chlorophyll content of the cells. It was found safe, to avoid loss of light, to have 300 μl of cells in each vessel.



No influence of the cell concentration on the yield was observed when light absorption was complete and shaking adequate. By this method, both O_2 and CO_2 exchanges were obtained simultaneously and independently for any and every desired period of measurement, and every yield determination was connected with an experimental determination of the relationship CO_2/O_2, so that earlier uncertainties concerning this ratio (γ) were eliminated.

VI. Intermittency of Illumination

The cross-section of the light beam entering the vessels was about 3 cm^2, that is, 3/8 of the bottom area of the vessel. It can be calculated, if we disregard the scattering of light, that the major part of the red light (75%) is absorbed within a distance of about 1 mm from the bottom of the vessel. This means that the light absorbing volume is only about 1/20 of the 7 ml of the cell-suspension.

Let now the intensity of the red light be so strong, that the oxygen consumption of the whole cell suspension is compensated by the oxygen evolution (compensation point for O_2). Then the oxygen development in the absorbing volume of the cell suspension may approach 20 times the point where the cells become saturated with light and the increment yield zero (with our cell conditions the saturation intensity is about 30—40 times the compensation intensity). But we obtain maximum or high yields when the vessels are shaken as described at not only compensating but even considerably higher intensities, when the latter are provided by white light. This proves that under our shaking conditions the cells alternate so

frequently between darkness and illumination that the concentrations of the participants of all dark reactions virtually retain their dark values—a consideration which shows the methodological importance of the kind and rate of shaking.

VII. Yield Determinations above the Compensation Point

A limiting feature of most earlier yield determinations was the low total light intensity, so low that only a fraction of the respiration was compensated for by the light action. Thus the yield determinations were in a sense determinations of inhibited or diminished respiration. We have changed this situation by illuminating the vessels from above the thermostat by a 100-watt constant-voltage incandescent lamp (as diagrammed in Fig. 1), at such a distance that the pressure changes in the vessels become zero or positive; yield determinations were then made with measured amounts of red light added in the usual manner from below the vessel. The intensity of the white light at the vessel surface was considerably smaller per unit area than that of the red light but covered a many fold greater area and hence provided much more total effective light than did the red beam. Owing to this relationship of intensities it was possible to eliminate repiration as an experimental quantity, and to start the yield experiments at positive rather than negative pressures, and yet still obtain (as experience showed) virtually as good yields from the red light, whether the base line were darkness or the white light.

Another limiting feature of the earlier yield experiments was the short duration of not only the periods of illumination (10 minutes) but also the total length of the experiment (commonly less than one hour). By the use of white light we have now succeeded in extending the duration of the manometric yield experiments up to at least 10 hours, if not indefinitely. The effects of this important advance are several. In general, the yields may now be determined under nearly the same conditions as obtain during the growth and cultivation of the cells, since the light intensity, temperature, medium, and gas phase during the growth and manometry are essentially the same, and furthermore we have found that the shaking does not change the cells under these conditions.

VIII. Examples of Data

Protocols 1, 2, and 3 provide examples of the data obtained.

PROTOCOL No. 1

Experiment of V-26-49. 20°C. 630—660 mμ. 5% CO_2 in air. 260 μl of cells per vessel. Each vessel alternating 10′ in dark and 10′ red light; thus when vessel No. 5 was dark, vessel No. 3 was illuminated, and vice versa.

Vessel No. 5	Vessel No. 3
V = 13.913 ml	V = 17.993 ml
v_f = 7.000 ml	v_f = 7.000 ml
k'_{O_2} = 0.665 k'_{CO_2} = 1.235	k_{O_2} = 1.046 k_{CO_2} = 1.634
80′ dark —91.5 mm	80′ dark —26.5 mm
80′ light + 1.5 mm	80′ light + 15.0 mm
80′ H′ + 93.0 mm	80′ H + 41.5 mm

(*Equation 1*) Action of light in 80′ $x_{O_2} = \dfrac{H \cdot k_{CO_2} - H' \cdot k'_{O_2}}{\dfrac{k_{CO_2}}{k_{O_2}} - \dfrac{k'_{CO_2}}{k'_{O_2}}} = +151\ \mu l$

(*Equation 2*) $x_{CO_2} = \dfrac{H \cdot k_{O_2} - H' \cdot k_{CO_2}}{\dfrac{k_{O_2}}{k_{CO_2}} - \dfrac{k'_{O_2}}{k'_{CO_2}}} = -168\ \mu l$

Actinometer: —8.83 μl O_2 per minute

Quantum efficiency for O_2, $\dfrac{1}{\varphi} = \dfrac{80 \cdot 8.83}{151} = \underline{4.7}$

Quantum efficiency for CO_2, $\dfrac{1}{\varphi} = \dfrac{80 \cdot 8.83}{168} = \underline{4.2}$

Assimilatory quotient, $\gamma = \dfrac{CO_2}{O_2} = \dfrac{-168}{+151} = -1.11$

If $\gamma = \dfrac{CO_2}{O_2} = -1.11$ is determined for a given cell suspension, then x_{O_2} and x_{CO_2} can be obtained by the pressure changes in light and dark in each single vessel. For example, in vessel No. 5, the following figures, taken immediately prior to the readings above, were obtained upon illumination with light of an actinometer value of —5.07 μl O_2 per minute:

Vessel No. 5

10′ dark —12.5 mm 10′ light — 2.5 mm 10′ dark — 13.0 mm	10′ H′ = + 10.2 mm	20′ H′ = + 20.2 mm
10′ light — 1.5 mm 10′ dark — 10.0 mm	10′ H′ = + 10.0 mm	

(*Equation 3*) Action of light in 20′; $x_{O_2} = H' \dfrac{k'_{CO_2} \cdot k'_{O_2}}{k'_{CO_2} + \gamma \cdot k'_{O_2}} = 20.2 \cdot 1.62 = +32.8$

$x_{CO_2} = -1.11 \cdot x_{O_2} = +32.8 \cdot -1.11 = -36.4$

Quantum efficiency for O_2, $\dfrac{1}{\varphi} = \dfrac{20 \cdot 5.07}{32.8} = \underline{3.1}$

Quantum efficiency for CO_2, $\dfrac{1}{\varphi} = \dfrac{20 \cdot 5.07}{36.4} = \underline{2.8}$

PROTOCOL No. 2

Experiment of V-30-49. 20°C. 630—660 mμ. 5% CO_2 in air. 270 μl of cells per vessel.

Experiment I. Alternately dark and light each 10′. Actinometer for the red light (total) 5.4 μl O_2 per minute. When vessel No. 5 was dark, No. 3 was illuminated and vice versa.

No. 5 Constants as in Protocol 1	No. 3 Constants as in Protocol 1
10′ dark — 10.5 mm 10′ light + 0.5 mm	10′ dark — 2.0 mm 10′ light + 3.0 mm
10′ dark — 10.0 mm 10′ light 0 mm	10′ dark — 3.5 mm 10′ light + 2.0 mm
10′ dark — 9.0 mm 10′ light + 1.5 mm	10′ dark — 2.5 mm 10′ light + 3.5 mm
10′ dark — 8.5 mm 10′ light 0 mm	10′ dark — 2.5 mm 10′ light + 3.5 mm
10′ dark — 9.0 mm 10′ light + 1.0 mm	10′ dark — 0 mm 10′ light + 3.0 mm
10′ dark — 8.0 mm 10′ light + 1.0 mm	10′ dark — 1.0 mm 10′ light + 5.0 mm
60′ dark — 55.0 mm 60′ light + 4.0 mm	60′ dark — 11.5 mm 60′ light + 20.0 mm
60′:H′ = 4 + 55 = + 59 mm	60′:H = 20 + 11.5 = + 31.5 mm

Experiment II: Both vessels were now constantly illuminated with a 100-watt incandescent lamp of nonmeasured* light intensity and red light of measured intensity added for alternating periods of 5′. Actinometer for the red light (total) 5.4 μl O_2 per minute.

* But kept constant by a 500-watt voltage regulator.

No. 5		No. 3	
5′ white + 18.5 mm	5′(white + red) + 22.0 mm	5′ white + 14.0 mm	5′(white + red) + 15.0 mm
5′ white + 18.0 mm	5′(white + red) + 22.5 mm	5′ white + 14.0 mm	5′(white + red) + 16.5 mm
5′ white + 16.5 mm	5′(white + red) + 22.0 mm	5′ white + 12.5 mm	5′(white + red) + 16.5 mm
5′ white + 17.5 mm	5′(white + red) + 20.5 mm	5′ white + 14.0 mm	5′(white + red) + 14.0 mm
5′ white + 17.0 mm	5′(white + red) + 23.0 mm	5′ white + 11.5 mm	5′(white + red) + 15.0 mm
		5′ white + 12.0 mm	5′(white + red) + 14.5 mm
25′ white + 87.5 mm	25′(white + red) + 110 mm	30′ white + 78 mm	30′(white + red) + 91.5 mm
		30′:H = 91.5 — 78 = + 13.5 mm	
25′:H′ = 110 — 87.5 = + 22.5 mm		25′:H = 11.3 mm	

Calculation of quantum efficiency for experiment I (Dark ± Red)

In 60′: H + 31.5 mm H′ + 59 mm

Applying equations (1) and (2), protocol (1)

$$\left.\begin{aligned} \text{In } 60'\ x_{O_2} &= +\ 70.4\ \mu l \\ x_{CO_2} &= -\ 56.0\ \mu l \end{aligned}\right\} \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -0{,}8$$

$$\text{Quantum efficiency for } O_2,\ \frac{1}{\varphi} = \frac{60 \cdot 5.4}{70.4} = 4.6$$

$$\text{Quantum efficiency for } CO_2,\ \frac{1}{\varphi} = \frac{60 \cdot 5.4}{56} = 5.8$$

Calculation of quantum efficiency for experiment II (White ± Red)

In 25′: H + 11.3 mm H′ + 22.5 mm

Applying equations (1) and (2), protocol (I)

$$\left.\begin{aligned} \text{In } 25'\ x_{O_2} &= +\ 30.3\ \mu l \\ x_{CO_2} &= -\ 27.2\ \mu l \end{aligned}\right\} \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -\ 0.90$$

$$\text{Quantum efficiency for } O_2,\ \frac{1}{\varphi} = \frac{25 \cdot 5.4}{30.3} = 4.5$$

$$\text{Quantum efficiency for } CO_2,\ \frac{1}{\varphi} = \frac{25 \cdot 5.4}{27} = 5.0$$

Experiment III, with the same cells, was performed between experiments I and II, the white light being, however, of somewhat lower intensity. Here only *one* vessel (No. 5) was used; but if we take as γ the average value of experiments I and II, that is — 0.85, x_{O_2} can be calculated according to equation (3), protocol (1). The readings in vessel (5) were:

No. 5	
5′ white + 5.0 mm	5′(white + red) + 11.5 mm
5′ white + 6.5 mm	5′(white + red) + 9.5 mm
5′ white + 6.5 mm	5′(white + red) + 9.5 mm
5′ white + 5.5 mm	5′(white + red) + 13.0 mm
5′ white + 7.0 mm	5′(white + red) + 15.0 mm
25′ white + 30.5 mm	25′(white + red) + 58.5 mm

25′: H′ = 58.5 — 30.5 = + 28 mm

and with γ = — 0.85

$$25'\ x_{O_2} = +\ 34\ \mu l$$

The quantum efficiency with the actinometer value of experiments I and II (5.4 μl O_2 per minute) was

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{25 \cdot 5.4}{34} = \underline{4.0} \text{ for } O_2$$

The total duration of these experiments was 7 hours from the time of initial equilibration until the last yield determination that gave a value $\frac{1}{\varphi}$ = 4.5 for oxygen, which was obtained at approximately 4 times the compensation point. The final pH in the cell suspensions was 5.4.

PROTOCOL No. 3

Comparison of the yield in carbonate-bicarbonate mixtures and in culture medium

Experiment of VI-1-49. 20°C. 630—660 mμ. Three vessels, in each 7 ml cell suspension, containing 200 μl of cells. Cultures centrifuged, then washed once in, and taken up in, carbonate-bicarbonate mixture. Intensity 5.4 μl O_2 per minute.

I. Vessel No. 7.
V = 13.824 ml
v_f = 7.00 ml
k_{O_2} = 0.657

Gas space air. Solution 85 parts M/10 $NaHCO_3$ + 15 parts M/10 K_2CO_3; pH 9.2. *At compensation point with white light.*

15′ white light	0
15′ white light + red light	+ 11.5 mm
15′ white light	0
15′ white light + red light	+ 11.5 mm
15′ white light	— 0.5 mm

Light action 30′ + 23 + 0.5 = + 23.5 mm = 15.4 μl

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{30 \cdot 5.4}{15.4} = \frac{162}{15.4} = \underline{10.5}$$

II. Vessels Nos. 3 and 5, containing 7 ml culture medium, pH 4.9, with 200 μl of cells each. Cultures centrifuged, then washed once in, and taken up in, fresh culture medium. Gas space 5% CO_2 in air. Mirror shifted every 10′ from one vessel to the other; actinometer 5.4 μl O_2 per minute for red light.

No. 3		No. 5	
V	= 17.993 ml	V	= 13.913 ml
v_f	= 7.000 ml	v_f	= 7.000 ml
k_{O_2}	= 1.046	k'_{O_2}	= 0.665
k_{CO_2}	= 1.634	k'_{CO_2}	= 1.253

15′ white light	+ 11.0 mm	15′ white light + red light	+ 29.5 mm
15′ white light + red light	+ 17.0 mm	15′ white light	+ 15.5 mm
15′ white light	+ 10.5 mm	15′ white light + red light	+ 29.0 mm
15′ white light + red light	+ 16.0 mm	15′ white light	+ 17.5 mm
30′ H =	+ 11.5 mm	30′ H′ =	+ 25.5 mm

$$\left.\begin{array}{l} x_{O_2} = +\ 41.3 \text{ mm} \\ x_{CO_2} = -\ 43.0 \text{ mm} \end{array}\right\} \gamma = -\ 1.04$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{30 \cdot 5.4}{41.3} = \frac{162}{41.3} = 3.9$$

III. Vessel No. 7, with same cells as before but without white light (below compensation-point). pH 9.2

10′ dark	— 33.5 mm
10′ red light	— 23.5 mm
10′ dark	— 30.5 mm
10′ red light	— 22.5 mm
10′ dark	— 30.0 mm
20′ dark	— 60.5 mm

20′ dark — 62.7 mm, 20′ red light — 46.0 mm

Light action 20′ 62.7 — 46 = + 16.7 mm = 11 μl

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{20 \cdot 5.4}{11} = \underline{9.8}$$

IV. Again Nos. 3 and 5, but no white light (under compensation point) pH 4.9

No. 3		No. 5	
10′ dark	— 4.0 mm	10′ red light	— 5.0 mm
10′ red light	— 1.5 mm	10′ dark	— 12 mm
10′ dark	— 5.0 mm	10′ red light	— 4.5 mm
10′ red light	— 1.5 mm	10′ dark	— 13 mm
10′ dark	— 5.0 mm	10′ red light	— 4.0 mm
30′ dark	— 14.0 mm	30′ dark	— 37.6 mm
30′ red light	— 4.5 mm	30′ red light	— 13.5 mm

Light action H = + 9.5 mm H′ = + 24.1 mm

30′ $\left.\begin{array}{l} x_{O_2} = +\,45.6 \\ x_{CO_2} = -\,53.0 \end{array}\right\}\ \gamma = -\,1.18$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{30 \cdot 5.4}{45.6} = \underline{3.6}$$

V. Again No. 7, but with half light intensity (Actinometer, 2.75 μl O_2 per minute), pH 9.2.

10′ red light	— 24 mm
10′ dark	— 28 mm
10′ red light	— 24.5 mm
10′ dark	— 27.0 mm
10′ red light	— 23 mm

Light action 10′ 27.5 — 23.8 = + 3.7 mm = 2.42 μl

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{10 \cdot 2.75}{2.42} = \underline{11.3}$$

The total duration of these experiments was 8 hours.

IX. Summary and Conclusion

Since development of the new methods and procedures described, in a sequence of thirty experimental days, almost without exception quantum efficiencies of 3 to 5 quanta per molecule of O_2 produced by the action of red light have been obtained. The simultaneously observed quotients of $\frac{CO_2}{O_2}$ for light action lay between —0.8 and —1.3, which means that the quantum efficiencies for CO_2 consumption in red light were essentially the same as those for O_2 production.

These results were obtained not only with low light intensities below the compensation point and for short periods of time (minutes), but also with light intensities well above the compensation point (several fold), and in experiments lasting many hours. It is important to emphasize that with the same cell suspension the same quantum yields may be obtained both below and far above the compensation point.

The new results resolve several uncertainties left open by the experiments of 1923. At that time the light intensities were so low that only a fraction of the respiration was compensated by the light. Thus the objection could never have been refuted that light inhibited respiration anticatalytically, that is, without expenditure of energy. But now, in the experiments above the compensation point, this question is eliminated, and chemical energy, corresponding to positive O_2 production and CO_2 consumption, is in fact clearly gained.

It was a further shortcoming of the experiments of 1923, that the yields had been determined only for short periods of time (*e.g.*, 10 minutes). But now, in the experiments above the compensation point, the cells are so nearly under their natural culture conditions, that there is no evident time limit to yield determinations. Thermodynamically this is a noteworthy advance since the longer the experiments the surer becomes the necessary condition of all calculations of yield: that the absorbed light energy is the sole source of energy for the photosynthetic processes.

Finally, we may point out that the methodology has been so simplified that efficiency determinations can be carried out wherever simple manometric equipment and a suitable light source are available, without the need of a bolometer, thermopile, cathetometer or special differential manometer. In fact, demonstration of the high quantum efficiencies reported in this paper may readily be made in the laboratory class-room.

Acknowledgements

Valuable aid in these experiments was provided by Mrs Lois B. Macri, Mrs Clara F. Smith, and C. R. Newhouser. The culture of *Chlorella pyrenoidosa* was provided by Dr F. E. Allison of the *Plant Industry Station, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland.* We wish to thank E. Machlett and Son, New York City, for special facilitation of provision of the manometric glassware, and the American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, for the specially adapted thermostat and shaking mechanism employed.

Résumé et Conclusions

Depuis le développement des nouvelles méthodes et des nouveaux procédés décrits, nous avons trouvé, à peu près sans exception, une efficience de 3 à 5 quanta par molécule d'oxygène produite par l'action de la lumière rouge. Les coefficients $\frac{CO_2}{O_2}$ observés simultanément pour l'action de la lumière se trouvaient entre -0.8 et -1.3, ce qui signifie que l'efficience en quanta pour la lumière rouge est à peu près la même pour la consommation de CO_2 que pour la production de O_2.

Ces résultats ont été obtenus non seulement pour de faibles intensités et de courtes périodes, mais aussi pour des intensités bien au-dessus du point de compensation (plusieurs fois) et pour des expériences durant plusieurs heures. Il est intéressant de noter que l'on peut obtenir les mêmes rendements en quanta pour une même suspension cellulaire au-dessous et au-dessus du point de compensation.

Les nouveaux résultats résolvent plusieurs incertitudes qui avaient subsistées après les expériences de 1923. A cette époque, les intensités de lumière étaient si faibles que seule une fraction de la respiration était compensée par la lumière. C'est pourquoi, l'objection n'a jamais pu être réfutée selon laquelle la lumière empêcherait la respiration anticatalytiquement ,c.à.d. sans dépense d'énérgie. Actuellement cette question se trouve éliminée par les expériences au-dessus du points de compensation et on a vraiment un gain en energie chimique correspondant à une production positive de O_2 et une consommation de CO_2.

Une autre insuffisance des expériences de 1923 est due au fait que les rendements avaient été déterminés seulement pour des périodes brèves (p. ex. 10 minutes). Actuellement, où l'on travaille au dessus du points de compensation, les cellules se trouvent si près de leurs conditions de culture naturelles qu'il n'y a pas de temps limité évident pour les déterminations de rendement. C'est un sérieux avantage du point de vue thermodynamique, car plus les expériences sont longues, et plus sûrement la condition nécessaire pour toute détermination de rendement sera remplie, c.à.d. que la lumière absorbée soit la seule source d'énérgie pour le processus photosynthétique.

Finalement, nous avons, tellement simplifié la méthodologie que des déterminations d'efficience simplifiées peuvent être effectuées facilement partout où l'on dispose d'un manomètre et d'une

source de lumière adéquate. On n'a pas besoin de bolomètre, de thermopile, de cathétomètre, ni de manomètre, différentiel spécial. En effet l'on peut démontrer l'efficience quantique élevée, rapportée dans ce mémoire, dans un laboratoire de classe.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Seit die hier beschriebenen neuen Methoden und Verfahren entwickelt worden sind, haben wir in einer Reihe von 30 Arbeitstagen fast ohne Ausnahme Quantumsleistungen von 3 bis 5 Quanta pro Molekül O_2 (gebildet unter der Einwirkung von rotem Licht) gefunden. Gleichzeitig wurden Quotienten $\frac{CO_2}{O_2}$ für die Lichtwirkung gefunden, die zwischen — 0.8 und — 1.3 lagen; dies bedeutet, daß die Quantenleistung in rotem Licht für CO_2-Aufnahme und O_2-Abgabe ungefähr gleich war.

Diese Ergebnisse wurden nicht nur für niedrige, unter dem Kompensationspunkt gelegene Lichtintensitäten und für kurze Zeitspannen (Minuten) gefunden, sondern auch für hohe, weit über dem Kompensationspunkt gelegene Lichtintensitäten und für Versuche von mehreren Stunden. Mit der gleichen Zellsuspension kann man unter- und oberhalb des Kompensationspunktes dieselbe Quantumausbeute erhalten.

Die neuen Ergebnisse beheben einige Unsicherheiten der Versuche von 1923. Damals waren die Lichtintensitäten so gering, daß nur ein Teil der Atmung durch das Licht kompensiert wurde. Der Einwand, daß das Licht die Atmung antikatalytisch, also ohne Energieverbrauch hemme, konnte daher nie widerlegt werden. Nun aber, in den Versuchen oberhalb des Kompensationspunktes, ist diese Frage erledigt; es wird wirklich Energie entsprechend der Abgabe von O_2 und Aufnahme von CO_2 gewonnen.

Ein anderer Mangel der Versuche von 1923 bestand darin, daß die Ausbeuten nur über eine kurze Zeitspanne (z. B. 10 Minuten) bestimmt wurden. Nun aber, in den Versuchen oberhalb des Kompensationspunktes, befinden sich die Zellen so nahe den Bedingungen einer normalen Kultur, daß eine offensichtliche Zeitgrenze für Bestimmungen der Ausbeute nicht besteht. Thermodynamisch gesehen ist das ein wichtiger Fortschritt, denn je länger die Versuchszeit, desto sicherer wird die für alle Berechnungen der Ausbeute notwendige Bedingung erfüllt sein: daß nämlich die absorbierte Lichtenergie die einzige Energiequelle für den photosynthetischen Vorgang sei.

Endlich können wir darauf hinweisen, daß wir die Methodologie so vereinfacht haben, daß Leistungsbestimmungen mit einem einfachen Manometer und einer passenden Lichtquelle, ohne Bolometer, Thermoelement, Cathetometer und Spezial-Differentialmanometer, ausgeführt werden können. So können die hier mitgeteilten hohen Quantumsleistungen im Schullaboratorium nachgewiesen werden.

Appendix

Emerson has objected[2, 5] to the yield determinations of 1923[1] and 1948[4] on the ground that the assimilatory $\gamma = CO_2/O_2$ was not determined simultaneously with the yield φ; *i.e.*, that the value of γ employed, — 0.91, which had been determined gas analytically, may not be the γ during the different φ-determinations carried out for different periods of time, light intensities, and cell cultures.

As has been mentioned, we have observed experimental fluctuations of γ from—0.8 to—1.3 If we had used these γ-values in 1923 for the computation of φ, let us see what the values of φ would have been.

The volume of our vessel was 37.0 ml and the volume of the liquid phase 16.53 ml. For 10°C

$$k_{CO_2} = 5.67 \qquad k_{O_2} = 1.70$$

$$K_{O_2} = \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma\, k_{O_2}} = \frac{5.67 \cdot 1.70}{5.67 + \gamma\, 1.70}$$

Therefore

γ	K_{O_2}	Quantum requirement $\frac{1}{\varphi}$
—0.8	2.24	4.20
—0.91	2.34	4.00
—1.3	2.78	3.40

where the underlined values are the values used and obtained in 1923. This calculation shows that EMERSON's objection was not very significant and could not explain the divergent quantum requirements of 4 against 10 to 12.

II. In an effort to avoid difficulties caused by fluctuations of γ. EMERSON and LEWIS made quantum-efficiency measurements in carbonate-bicarbonate solutions at pH 9.1, which kept the CO_2-pressure constant instead of using culture medium at pH 4.9. They claimed[5] that in such alkaline solutions the quantum-efficiency was the same as in the acid culture medium: "then we find the yields measured in acid phosphate culture medium are in good agreement with those measured in carbonate mixture".

But the experimental data were not presented to substantiate this important statement. We can confirm EMERSON's finding that in the carbonate-bicarbonate mixtures the quantum-requirement is 10 to 12, but we cannot confirm that the same quantum efficiency is obtained in the acid culture medium. Data presented in protocol 3 show that very different quantum-efficiencies are obtained if we determine the quantum efficiency of aliquot portions of a cell suspension in carbonate mixture at pH 9.1 and in culture medium at pH 5. The quantum values observed in the following time sequence were

	$\frac{1}{\varphi}$
In carbonate mixture at pH 9	10.5*
In culture medium at pH 5	3.9*
In carbonate mixture at pH 9	9.8
In culture medium at pH 5	3.6
In carbonate mixture at pH 9	11.3

where the asterisked values were obtained above the compensation point and the others below the compensation point.

Maximum yields should therefore not be determined in the carbonate mixture, as has been done frequently during the last 10 years.

References

1 WARBURG, O., Über die katalischen Wirkungen der lebendigen Substanz, Julius Springer, Berlin 1928.

2 FRANCK, J., and LOOMIS, W. E., Photosynthesis in Plants, The Iowa State College Press, Ames, Iowa 1949.

3 WARBURG, O., and SCHOCKEN, V., Arch. Biochem. 21 (1949), 363.

4 WARBURG, O., Am. J. Botany 35 (1948), 194.

5 EMERSON, R., and LEWIS, C. M., Am. J. Botany 28 (1941), 789.

6 The Maximum Efficiency of Photosynthesis: A Rediscovery*

DEAN BURK, STERLING HENDRICKS, MITCHELL KORZENOVSKY, VICTOR SCHOCKEN and OTTO WARBURG

It was reported in 1923[1] that in photosynthesis 4 light quanta, absorbed by chlorophyll in green cells, can produce one molecule of oxygen under favorable conditions. This means that with red light about 65 percent of the absorbed radiant energy can be transformed into chemical energy. Quanta of red light are of low energy ($\sim$ 44,000 cal/mole) and several such quanta must therefore cooperate to develop one molecule of oxygen, which requires $\sim$ 112,000 cal/mole. No analogy is known in the nonliving world, where most photochemical reactions, although simpler and effected by quanta of higher energy, are far less efficient in energy transformation, and are indeed usually exothermic. It became clear that an unknown principle, active in nature, awaited elucidation by physics and chemistry.

It is well known how the anticipated study of this new principle was interrupted about 1938, when almost every investigator in the field came to accept as the maximum efficiency of the energy transformation low values of 20 to 25 percent, that is to say, quantum values of 10 to 12 with red light. The development of this revocation has been extensively summarized in a book just published in the last few months by JAMES FRANCK and WALTER LOOMIS[1] and contributed to by a series of investigators.

We have reinvestigated the problem and have rediscovered the high efficiency of energy transformation in photosynthesis. The data obtained are conclusive.

In the course of this reinvestigation the methods have been simplified and improved in such a way that determinations of quantum requirements are no longer the privilege of the few. On the contrary, anyone who has a suitable light source and simple manometric equipment can now determine quantum requirements and convince himself that in green cells the greater part of the absorbed light energy can be transformed into chemical energy (see Addendum).

Improvements in Technique

Culture of cells. A strain of *Chlorella pyrenoidosa*, used in various institutes for many years and originally isolated and identified by FLORENCE MEIER, of the Smithsonian Institution, was cultivated in 300-ml gas wash bottles of the Drexel type. The culture medium was 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g KNO_3, 2.5 g KH_2PO_4, 2 g NaCl, and 5 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, dissolved in 1000 cm^3 of nonsterilized well water (pH 4.5 to 5.0). Approximately 100 mm^3 of cells suspended in 200 cm^3 culture medium was added to each bottle, and aerated with 5 percent CO_2 in air so rapidly ($\sim$ 500 ml/min) that no sedimentation of the cells occurred. They were illuminated with a 100-w incandescent lamp that raised the temperature in the bottles to 25—30°C.

* Republished from Science 110 (1949): 225 by permission.

After several days, when the cells had multiplied several fold, and the pH had risen 0.5 to 1 unit, the cultures were used for yield experiments. Such cells gave stable respiration values and high yields without exception. This culture method, which had been employed by one of us (D.B.) for many years in Washington, was found to be an important improvement over the method of 1923[4] followed by most later investigators but which we have now discarded. In the earlier method, slowly aerated cells settled down in Erlenmeyer flasks in sediments that were inadequately illuminated and inadequately supplied with carbon dioxide and oxygen until reshaken up.

Manometry. Approximately 300 mm^3 of cells, resuspended in 7 cm^3 of a fresh culture medium of pH 4.9, were put into rectangular vessels of 14 to 20 cm^3 volume and saturated with 5 percent CO_2 in air. Two vessels were used to determine, as described in 1924[3], the oxygen as well as the carbon dioxide exchange The gas volumes in the two vessels were different, but the volumes of the solutions and therefore the concentrations of the cells were equal. The vessels were shaken at 20°C. by horizontal motion, with an amplitude of 2 cm. and a frequency of 150 per min. In spite of this rapid motion, which moved the vessels 600 cm. per minute, no splashing or foaming occurred, even in experiments of more than 20 hr. duration. It was a further improvement owing to this motion that physical transition effects were not observed upon change from dark to light and vice versa, that is, the gas equilibration was virtually perfect for our purposes.

The well known requirement of the two-vessel method, that the metabolism in the two vessels must be identical ($x_{O_2} = x'_{O_2}$ and $x_{CO_2} = x'_{CO_2}$) was complied with by eliminating a dangerous differential time factor as nearly as possible. The light beam of measured intensity (630 to 660 mμ) was shifted by a mirror alternately from one vessel to the other at intervals of 10—60 min. or these vessels were shifted alternately into and out of the fixed light beam. Thus in every case the one vessel was illuminated when the other vessel was dark and vice versa, and when many light and dark periods followed each other and the pressure changes of all dark periods and of all light periods were summed, the metabolism in the two vessels was virtually identical for the same periods of elapsed time. The total pressure changes effected by light were usually of the order of magnitude of + 20 to + 50 mm. These figures were differences between two rates of oxygen consumption (negative pressure changes) in the experiments with noncompensated respiration. But when the respiration was compensated by white light (see following section) the figures + 20 to + 50 mm. were the directly observed positive pressure changes, produced by the added red light. To measure such great pressure changes simple Haldane-Barcroft blood-gas manometers could be used instead of the special differential manometer heretofore employed.

Measurement of the quantum intensity. The bolometer used in 1923 was replaced by the chemical actinometer described a few months ago[6]. This resulted not only in a simplification but in an improvement in accuracy. When the oxygen produced by the red light been measured, the vessel containing the cells was replaced by a similar vessel containing 2 mg. of ethyl chlorophyllide, 200 mg. of thiourea and

7 cm.^{3} of pyridine, with tank oxygen as the gas phase. The light absorption being complete in the cell suspension as well as in the ethylchlorophyllide solution, the quantum requirement per molecule oxygen was obtained by the very simple equation:

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{h \cdot \nu}{O_2} = \frac{O_2 \text{ consumed by the actinometer,}}{O_2 \text{ produced by the cells}}$$

where the consumption and the production of the oxygen must be calculated for equal time periods.

Complete absorption is the only method so far devised by which the *absorption* of the light and the *action* of the light can be measured manometrically under the same conditions. Thus far all manometric determinations of quantum requirements using incomplete absorption are contradictory and uncertain. On the other hand, the main objection against the method of complete absorption was the existence of too great a respiration relative to the measured light action; this objection is no longer valid because today respiration can be eliminated by compensating with white light or components thereof (see the following section).

A New Principle

Let us consider a *Chlorella* suspension, shaken in a beam of red light that is absorbed completely, to be a machine that transforms light energy into chemical energy. The efficiency of this machine will be known if we know the light energy entering the vessel and the amount of oxygen developed in it, one mole of oxygen being equivalent to the production of about 112,000 cal. No theory of the mechanism of this energy transformation can alter the observed result of such an efficiency determination.

Yet there are possible objections to be answered. When at low light intensities respiration still exceeds photosynthesis, then our machine does not produce a net gain of chemical energy, and it might be considered that the light merely inhibits the loss of chemical energy. Since respiration is a catalytic process. conceivably its inhibition by light could be merely anticatalytic, requiring no expenditure of energy. Hence the calculation of the efficiency might be safe thermodynamically only when the light intensities are so high that oxygen is in fact given off from the cell suspensions into the gas space.

To comply with this requirement we illuminated the cell suspensions with white light (of nonmeasured intensity) over the greater part of the vessel surface, the light intensity per unit area being relatively small, but the influx of light energy through the total area of the vessel being sufficient to compensate or overcompensate the respiration of the cell suspensions. As the compensating light intensity we define here that light intensity which effects the result no oxygen enters or leaves the cell suspension. It is very likely that in this state the oxygen exchange of all cells in the suspension is zero, owing to the rapid motion of the cells. It is obvious that our compensating light intensity varies with the amount of cells in the vessel and is not to be confused with the compensating light intensity for very thin cell suspensions.

When the steady state in the white light was reached, a beam of red light of measured intensity was sent through the bottom of the vessel into the cell suspension, the cross section of the beam being 3 cm.^{2} and the total energy flux about 0.25 microeinsteins/min. It was completely absorbed in the cell suspension. The increase of positive pressure effected by the red light and the intensity of the red light were the two magnitudes from which the efficiency of the energy transformation of the added red light was calculated. The efficiency so found with red light proved to be as high, at and several fold above the compensation point with white light, as the efficiency at zero or low white light intensities below the compensation point (3 to 5 quanta per O_2 molecule developed; see Examples 1—5).

This result raised the whole level of certainty in this field of investigation, and is probably owing in large part to the rapid motion of a great amount of cells. The time of illumination with red light of relatively high intensity must be so short for every cell that no Blackman or other dark reaction limits the action of the light; in other words the product of light intensity and time ($i \times t$) must be too small to alter the concentrations of dark reactions. The observed efficiency is, of course, a fact that is independent of all theories about what happens in the cell suspensions, chemically or physically.

Another factor that might limit the certainty of efficiency determinations is time of illumination. The shorter the time periods, the greater is the danger that the energy of some dark reaction contributes to the oxygen production. The longer the time periods, the more certain are we that we have reached the thermodynamically desirable state in which the concentrations of all cell constituents are kept constant.

From 10 min. in 1923[4] and 15 min. in 1948[5] we have now extended the time periods to more than 20 hr. of continuous illumination with white light, producing continuous positive pressure, and have varied the periods of the efficiency determinations with added red light from 5 to 60 min. This great improvement was possible because the horizontal motion of the rectangular vessels did not damage the photosynthetic capacity of the cells and because the white light, when it overcompensated respiration, stabilized the chemical conditions in the cells. In fact, the efficiency of the energy transformation has now been measured under the conditions of growth, so that very likely the experiments can be extended to any length of time.

Nonaction of Light on Respiration

If the manometric efficiency of the red light is the same when the respiration of the cell suspensions is noncompensated, compensated, or several fold overcompensated by added unmeasured white light, then obviously every theory should be rejected that assumes that light acts on the process of respiration anticatalytically or stoichiometrically. This conclusion has now been confirmed independently by the following type of experimentation:

A rectangular vessel was set up to contain NaOH and glass beads in two side arms, 300 mm.^{3} of cells in 7 ml. of culture medium (pH 4.5—5) in the main compartment, and air in the gas phase. The vessel was shaken at 20^{0}C. slowly or ra-

pidly, and in the dark or in the light. By changing the rate of shaking the steady-state pressures of CO_2 in liquid and gas phases were changed, but in the dark this had no effect on the observed rate of respiration. In the light, the rate of oxygen consumption decreased in the slowly shaken vessel; but in the rapidly shaken vessel, where the steady-state pressure of CO_2 was lower, *no action of light on the rate of oxygen consumption was observed* when the intensity of the light entering the vessel was about 0.25 microeinsteins/min., an intensity that with adequately high CO_2 pressures gave high photosynthetic efficiencies (3 to 5 quanta per molecule of O_2 developed). The shaking effect was reversible, the action of the light alternately appearing or disappearing with decreasing or increasing shaking rate.

The experiments may be extended to higher light intensities, but the higher the light intensity the more effective must be the removal of the carbon dioxide, for which the light and the alkali compete. The CO_2 pressure required to yield maximum respiration is clearly below that needed for effective photosynthesis where CO_2, functions as subtrate and not merely catalytically.

Such experiments prove that the light did not interfere with the process of respiration, either anticatalytically or stoichiometrically by reduction of intermediates.* Light, when it compensated respiration, did so by producing oxygen, and because the gas exchange of photosynthesis happens to be the reverse of the gas exchange of respiration. Thus a question, old as the science of photosynthesis, has been answered by the most simple of experiments.

Examples

1. Manometric pressure changes effected by red light when respiration was not compensated by white light. Two-vessel method, culture medium pH 5, gas phase 5% CO_2 in air. 20°C

Vessel I: $v = 13.913$, $v_F = 7.00$ — Vessel II: $v' = 17.993$, $v'_F = 7.00$

Actinometer 5.4 mm.^{3} O_2/min

Vessel I	Vessel II
10 min dark —26 mm	10 min dark —12 mm
10 min dark —23 mm	10 min dark —10 mm
10 min dark —23 mm	10 min dark —11 mm
10 min dark —23 mm	10 min dark —11 mm
40 min dark —95 mm	40 min dark —44 mm
10 min light —17 mm	10 min light — 7 mm
10 min light —15 mm	10 min light — 7 mm
10 min light —14 mm	10 min light — 7 mm
10 min light —15 mm	10 min light — 7 mm
40 min light —61 mm	40 min light —28 mm
Light action + 34 mm	Light action + 16 mm

$$\left.\begin{array}{l} x_{O_2} \text{ in 40 min} + 51.6 \text{ mm.}^3 \\ x_{CO_2} \text{ in 40 min} - 53.7 \text{ mm.}^3 \end{array}\right\} \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -1.04$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{h\nu}{O_2} = \frac{40 \cdot 5.4}{51.6} = 4.2$$

* *Zusatz 1961.* Aber vergleiche Arbeit 11 dieses Buchs.

2. Manometric pressure changes effected by red light at 20°C, when respiration was over-compensated by white light. pH 5.0. gas phase 5% CO_2 in air. Actinometer for red light 5.4 mm^3. O_2/min.

Vessel I $v = 13.913$, $v_F = 7.00$ Vessel II $v' = 17.993$, $v'_F = 7.00$

Vessel I			
5 min white	+ 18.5 mm	5 min white + red	+ 22 mm
5 min white	+ 18.0 mm	5 min white + red	+ 22.5 mm
5 min white	+ 16.5 mm	5 min white + red	+ 22 mm
5 min white	+ 17.5 mm	5 min white + red	+ 20.5 mm
5 min white	+ 17.0 mm	5 min white + red	+ 23.0 mm
25 min white =	+ 87.5 mm.	25 min white + red =	+ 110 mm.

Action of red light + 22.5 mm in 25 min.

Vessel II			
5 min white	+ 14 mm	5 min white + red	+ 15 mm
5 min white	+ 14 mm	5 min white + red	+ 16.5 mm
5 min white	+ 12.5 mm	5 min white + red	+ 16.5 mm
5 min white	+ 14.0 mm	5 min white + red	+ 14.0 mm
5 min white	+ 11.5 mm	5 min white + red	+ 15.0 mm
5 min white	+ 12.0 mm	5 min white + red	+ 14.5 mm
30 min white =	+ 78 mm	30 min white + red =	+ 91.5 mm

Action of red light + 13.5 mm in 30 min.

$$\left.\begin{array}{l} x_{O_2} \text{ in 25 min} - 30.3\ mm^3 \\ x_{CO_2} \text{ in 25 min} - 27.2\ mm^3 \end{array}\right\} \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -0.9$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{h\nu}{O_2} = \frac{25 \cdot 5.4}{30.3} = 4.5$$

For the same culture, when the respiration was not compensated by white light, we obtained

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{h\nu}{O_2} = \frac{60 \cdot 5.4}{70.4} = 4.6$$

$$\text{and } \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -0.8$$

3. Manometric vessels continuously illuminated for 27 hr. by white light of approximately compensating intensity. $\frac{1}{\Phi} = \frac{h\nu}{O_2}$, for the added red light, at the beginning and end of the experiment.

In hours 1 to 4 respiration compensated, $\frac{1}{\Phi} = 4.5$ ($\gamma = -1.0$)

In hours 20 to 22, respiration compensated, $\frac{1}{\Phi} = 4.5$ ($\gamma = -1.0$)

In hours 27 to 28, respiration not compensated, $\frac{1}{\Phi} = 3.5$ ($\gamma = -1.27$)

4. Comparison of same culture in M/10 carbonate buffer (pH 9) and in culture medium (pH 5).*

* It may be gathered from this example that the efficiency in the unnatural carbonate buffer is only a fraction of the efficiency in culture medium. Many investigators believed that the efficiencies in both solutions were equal, and this was one of the reasons why the quantum requirement of 4 was denied by them and the figures 10 to 12 accepted.

Red light, 630—660 m μ. $I \sim 0.25$ microeinsteins/min 20°C.

Quantum requirement $\frac{1}{\Phi} = \frac{h\nu}{O_2}$ for the added red light.

In carbonate buffer, respiration compensated by white light, $\frac{1}{\Phi} = 10.5$

In culture medium, respiration compensated by white light, $\frac{1}{\Phi} = 3.9$ ($\gamma = -1.04$)

In carbonate buffer, respiration not compensad $\frac{1}{\Phi} = 9.8$

In culture medium, respiration not compensated $\frac{1}{\Phi} = 3.6$ ($\gamma = -1.18$)

In carbonate buffer, respiration not compensated $\frac{1}{\Phi} = 11.3$

5. Results by 2-vessel method for a series of experiments that were carried out from May 26 to June 16 of this year, at 20°C, in culture medium at pH 5, with an intensity of red light not exceeding 0.25 microeinsteins/min. No experiment is omitted.

$\frac{1}{\Phi}$	γ
$\left[\frac{h\nu}{O_2}\right]$	$\left[\frac{CO_2}{O_2}\right]$
3.2	— 1.08
4.6	— 0.80
4.5	— 0.90*
3.9	— 1.04
3.6	— 1.18
4.2	— 0.97
2.8	— 1.16
2.8	— 1.23
2.5	— 1.25
4.5	— 1.00**
4.7	— 0.93**
3.5	— 1.27
4.2	— 1.00
3.0	— 1.33
Average 3.7	— 1.08

It may gathered from Example 5 that the quantum requirement for carbon dioxide consumed can be equal to or somewhat greater or smaller than the requirement for oxygen produced. For we have

$$\frac{1}{\Phi} \cdot \frac{1}{\gamma} = \frac{h\nu}{O_2} \cdot \frac{O_2}{CO_2} = \frac{h\nu}{CO_2},$$

a magnitude which here for the first time, to our knowledge, has been determined in nutrient medium at low pH (about 5), and has been found to approximate

$$\frac{h\nu}{O_2} = 3 \text{ to } 5.$$

Yet the quantum requirement for oxygen is the more fundamental energy measure, because there is only one reaction in photosynthesis that produces oxy-

* Respiration overcompensated by white light from above.

** Respiration compensated by white light from above.

gen—the photochemical reaction (decomposition of water)*; but there are many different dark reactions that consume carbon dioxide to form a great variety of products. Thus if, as an extreme case, oxalic acid were formed from water and carbon dioxide γ for this compound would be — 4 and the quantum requirement for carbon dioxide would be only one-fourth of the requirement for oxygen.

Conclusion

It follows from the data obtained** that in the spectral region 630 to 660 mμ no more than 4 quanta are required to produce one molecule of oxygen gas. A requirement of 3 quanta is open to serious consideration, although thus far the average value in our experiments has been nearer 4 than 3.

A quantum requirement of 4 means that the efficiency of the energy transformation in our experiments was approximately $\frac{112{,}000 \cdot 100}{4 \times 44{,}000} = 65$ percent, whereas the quantum number 3 would mean an efficiency of about 85 percent.

In any event, under favorable conditions the greater part of the absorbed light energy can be transformed in green cells into chemical energy, and this is, to quote the man who laid the foundation of quantitative photochemistry, "a marvellous achievement of nature[2]".

Addendum

Quantum requirement determinations were demonstrated to, and carried out with the aid of, the students of the physiology class at the Woods Hole Marine Biological Laboratory on July 19 and 20. Requirements of 3 to 5 quanta per molecule of oxygen gas produced in photosynthesis were observed on these two days. The respiration was overcompensated several fold by light of unmeasured intensity from an incandescent lamp used with or without red filter (cut-off at $\leq$ 560 mμ). In two closely comparable, consecutive experiments, quantum requirements of 3.0 and 3.5 were obtained from measured red light (630—660 mμ). The aid of students Jack Durell, Richard Klein, Burlyn Michel, and Martin Schwartz in carrying out various of the class experiments is acknowledged gratefully.

References

1 Franck, James, and Loomis, Walter E., Photosynthesis in plants. Ames, Iowa: Iowa State College Press, 1949.

2 Warburg, Emil, Photochemic. Handbuch der Experimentalphysik 18 (1928), 655.

3 Warburg, Otto, Biochem. Z. 152 (1924), 51.

4 Reprinted in Katalytische Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin: J. Springer, 1928.

5 Amer. J. Bot. 35 (1948), 194.

6 Warburg, Otto, and Schocken, Victor, Arch. Biochem. 21 (1949), 363.

* *Zusatz 1961.* „Decomposition of water" ist beim heutigen Stand der Wissenschaft zu streichen.

** Reported in greater experimental detail in *Biochem. et Biophys. Acta*, October 1949 (Meyerhof-Festschrift volume); *Arch. Biochem.*, September 1949; and at meeting of Society of General Physiology, Woods Hole, Massachusetts, June 1949.

7 Does Light Inhibit the Respiration of Green Cells?*

By O. Warburg, D. Burk, V. Schocken, M. Korzenovsky and St. B. Hendricks

It is well known that the oxygen consumption of green cells may be decreased by illumination. The light intensity at which the oxygen exchange of a given culture becomes zero may be termed "compensating." Above this light intensity positive evolution of oxygen gas is observed. The mechanism of compensation by light has until now remained uncertain, but the simplest explanation is obviously the production of oxygen gas by photosynthesis; that is, since light clearly produces oxygen gas above compensation it is reasonable to suppose that it also does so below compensation. However, the idea, old as the science of photosynthesis, still persists that light inhibits respiration *per se*, either anticatalytically (as by inactivating respiratory enzymes), or by reducing intermediates of respiration. If this idea were true, most computations of photosynthetic efficiency would be invalidated because they have been carried out below the compensation point.

A decision on this much-discussed problem has been obtained from the following type of experimentation, performed many times. In the main compartment of a rectangular vessel, with two side-arms containing alkali, was placed a suspension of *Chlorella pyrenoidosa* cells in acid culture medium (pH 4.8), with air as gas phase. The vessel, attached to a manometer, was rapidly shaken and alternately darkened and illuminated from below with a beam of completely absorbed red light of the *same* intensity ($\sim$ 0.25 microeinsteins/min./3 cm.^{2} area) as employed in simultaneous quantum efficiency determinations on aliquot suspensions by the 2-vessel method with 5% CO_2 in air as gas phase. In the vessel with low CO_2 pressure, negligible light action was observed, the oxygen consumption in the dark and in the light being practically identical, whereas, with aliquots of the same suspension under otherwise identical conditions except for adequate CO_2 pressure, high efficiencies of 3 to 5 quanta absorbed per molecule of O_2 produced were observed both below and well above the compensation point, with no change in dark respiration at the widely different CO_2 pressures involved (see example).

This absence of light action on respiration at low CO_2 pressures may appear to contradict the experience of other investigators who, since the use of manometry in photosynthesis, have observed, in vessels containing alkali in side-arms or middle compartments, that the respiration of Chlorella could be compensated by light. The explanation for this apparent discrepancy is that such experiments were carried out with too high light intensities that were not controlled quantitatively by means of simultaneous efficiency determinations. Light and alkali compete for the small amount of CO_2 formed in respiration, so that, for every CO_2 pressure,

---

* Aus Archives of Biochemistry 23 (1949): 330.

however low, a light intensity exists that will compensate respiration, as we have confirmed when we have used light of sufficiently high intensity.

Our experiments show conclusively that red light does not inhibit the respiration *per se* when light intensities are employed that yield high photosynthetic efficiencies. When light compensates respiration it does so by the independent process of photosynthesis, the gas exchange of which happens to be the opposite of that of respiration. This result has been confirmed in a different way by determination and comparison of photosynthetic efficiency below and above the compensation point. Under the conditions of our experiments, reported in detail elsewhere*, the same high quantum efficiencies of 3—5 quanta per O_2 are obtained up to intensities at least five times the compensating intensity. That is, one molecule of oxygen developed above the compensation point, or one less molecule of oxygen consumed below the compensation point, as the result of light action, represents the same gain in chemical energy. All theories of light action should be in harmony with this nowestablished thermodynamic fact.

Example

Each of three vessels contained 230 mm.^{3} aliquots of *Chlorella pyrenoidosa* cells suspended in 7 cc. of culture medium (5 g. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g. KNO_3, 2,5 g. KH_2PO_4, 2 g. NaCl, and 5 mg. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in 1 l. of filtered, unsterilized well water at pH 4.5—5). Temperature, 20°C. Horizontal shaking at the rate of 150 cycles/min. at 2 cm. amplitude. Total intensity of red light beam (630—660 $m\mu$), 0.254 microeinsteins/min., equivalent actinometrically to 5.7 mm.^{3} O_2/min.

No. I. 0.2 cc. *N* NaOH in each side-arm, gas phase air.

(Vessel volume 18.87 cc., liquid volume 7.40 cc., k_{O_2} 1.09)

20′ dark	— 40 mm.	x_{O_2} = — 43.5 mm.^{3}
20′ red light	— 39 mm.	
20′ red light action	+ 1 mm.	x_{O_2} = + 1.09 mm.^{3}

$$\frac{h\nu}{O_2} = \frac{20 \times 5.7}{1.09} = 105$$

No. II. Gas phase 5% CO_2 in air, respiration not compensated by white light.

	Vessel 3	Vessel 5	
Total volume	17.99	13.91	
Liquid volume	7.00	7.00	
k_{O_2}	1.046	0.665	
k_{CO_2}	1.634	1.253	
20′ dark	— 13 mm.	— 27.5 mm.	x_{O_2} = — 40.6 mm.^{3}
20′ red light	— 2 mm.	— 7.0 mm.	
20′ red light action	+ 11 mm.	+ 20.5 mm.	x_{O_2} = — 23.8 mm.^{3}, x_{CO_2} = — 19 mm.^{3}; $\gamma = \frac{CO_2}{O_2} = -0.8$

$$\frac{h\nu}{O_2} = \frac{20 \times 5.7}{23.8} = 4.8$$

* In press, *Science* and *Biochim. Biophys. Acta* (Meyerhof Festschrift, October, 1949); and report delivered at meeting of Society of General Physiologists, Woods Hole, Mass., June 22. 1949.

No. III. Gas phase 5% CO_2 in air, respiration overcompensated several-fold by white light.

	Vessel 3	Vessel 5
20′ white light	+ 39 mm.	+ 57.5 mm.
20′ white + red light	+ 48 mm.	+ 76 mm.
20′ red light action	+ 9 mm.	+ 18.5 mm.

$$\left.\begin{cases} x_{O_2} = + 26 \text{ mm.}^3 \\ x_{CO_2} = - 26 \text{ mm.}^3 \end{cases}\right\} \gamma = \frac{CO_2}{O_2} = - 1.0$$

$$\frac{h\nu}{O_2} = \frac{20 \times 5.7}{26} = 4.4$$

It will be observed that the oxygen consumption in the dark in Nos. I and II is essentially the same (about 42 mm.^{3}/20′). This means that the CO_2 pressures used did not influence respiration, and that the CO_2 pressure required to obtain maximum respiration is below that required for effective photosynthesis, where CO_2 is required as substrate and not merely catalytically.

8 The Maximum Efficiency of Photosynthesis*

Otto Warburg and Dean Burk

Introduction

1. Early Experiments

The efficiency of the energy transformation in photosynthesis

$$E = \frac{\text{chemical energy gained}}{\text{light energie absorbed}}$$

was first determined with the unicellular green alga *Chlorella* in 1922—23[1]. Also introduced into investigations of photosynthesis at that time was manometry founded upon the different solubilities of O_2 and CO_2 in aqueous media. The well known equations of the one-vessel method were derived

$$x_{O_2} = h \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma \cdot k_{O_2}} \quad [1] \qquad x_{CO_2} = h \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{\frac{k_{CO_2}}{\gamma} + k_{O_2}} \quad [2]$$

where h is the observed pressure change and γ is the assimilatory quotient $x_{CO_2}/x_{O_2} =$ = cmm CO_2 exchanged/cmm. O_2 exchanged. h was measured with an accuracy of a few hundredths of a millimeter by a special cathetometer-microscope focused on a differential manometer that was kept in rapid circular motion. γ, which had to be known for the computation of the gas exchange x_{O_2} and x_{CO_2} by the above equations, was determined by gas analysis; the value of — 0.91 was obtained and used in Eqs. 1 and 2.

The problem of the scattering of light by the algal cells, the main source of difficulty in cell-photochemistry, was overcome by the introduction of complete light absorption. Thus, when the intensity of the light entering the manometric vessels had been measured, the absorbed light was obtained by the equation

$$\text{absorbed light} = \text{entering light}.$$

---

* Aus Archives of Biochemistry 25 (1950): 410.

For publications on earlier aspects of this investigation, with various collaborators, see Refs. 20, 21, and 22.

Zusatz 1961. Dies ist der Beginn der modernen Manometrie der Photosynthese. Alle möglichen Einwände sind diskutiert und experimentell geprüft worden. Mit den in den folgenden Jahren weiterentwickelten Methoden ist zum Beispiel entdeckt worden: der Quantenbedarf 1 der Sauerstoffentwicklung bei der Photosynthese; der Quantenbedarf 2,9 der Kohlensäurespaltung bei der Photosynthese; die Photokatalyse des blaugrünen Lichts bei der Photosynthese; die Glutaminsäure, ihr schneller Zerfall und ihre aerobe Rückbildung in Chlorella; die funktionelle Kohlensäure, ihr anaerober Zerfall und ihre aerobe Bildung in Chlorella.

Die Diskussion der vielen Einwände gegen den hohen Energieumsatz in Chlorella erscheint heute wie ein Kampf gegen Windmühlen, war aber damals, so kurz nach Beendigung des Krieges, notwendig. Heute würde man sagen, daß Emerson den Quantenbedarf 12 statt 3 fand, weil er seine Messungen bei einem Kohlensäuredruck von 20 mm statt bei 200 mm Brodie ausführte.

To measure the entering light, a bolometer was constructed with a light-absorbing area greater than the cross section of the light beam used. The total light intensity entering the vessel was then obtained by one single bolometric measurement, and the difficult and inaccurate integration of light intensities over the cross section of the light beam was avoided.

When the foregoing technique had been worked out, a series of 37 efficiency determinations were performed in 3 regions of the visible spectrum, and the manometric and bolometric readings obtained were presented. If the number of quanta absorbed by the chlorophyll of the cells was compared with the O_2 developed, the average quantum number of the series was 4, per molecule of O_2. Thus, in the red at 660 mμ, where the molar quantum energy is 43,000 cal., about

$$\frac{112{,}000}{4 \times 43{,}000} \times 100 = 65\%$$

of the absorbed light energy was transformed into chemical energy.

It may be emphasized that it is more important to compare the absorbed light with the O_2 developed rather than with the CO_2 consumed. The energy gained per molecule of O_2 is very much the same for most any of the possible end products of photosynthesis, whereas the gain of energy per molecule of CO_2 absorbed could be quite different for various possible end products. As an extreme example, one may note that if one of the end products of photosynthesis were oxalic acid, as in the equation

$$2H_2O + 4\,CO_2 + nh\nu = 2\,(COOH)_2 + O_2,$$

the gain of energy per molecule of oxygen developed here would obviously be four times the gain of energy per molecule of carbon dioxide consumed.

Efficiencies as high as 65% have thus far not been obtained in any endothermic photochemical reaction. Only one other photochemical reaction is known[2] to have an efficiency approaching that of photosynthesis, the ozonization of molecular oxygen by the wavelength 207 mμ,

$$3\,O_2 + 1\,h\nu = 2\,O_3,$$

with an efficiency of $\frac{68{,}000}{137{,}000} \times 100 = 50\%$. But this exceptionally high efficiency was obtained with quanta of the high energy of 137,000 cal./mole, whereas the high efficiency of photosynthesis was obtained with quanta of the low energy of 43,000 cal./mole, in a reaction that thermodynamically requires at least three such quanta.

Because the photosynthetic efficiency reported in 1923 was very high, doubts arose as to whether the results were correct. Some investigators, in fact, working with different methods[3], succeeded only in realizing much lower efficiencies. The doubts increased when[4, 5] an error was claimed to have been discovered in the method of 1923. It was alleged: that when *Chlorella*, previously kept in the dark, was illuminated for short periods (*e.g.*, 5—10 min.), CO_2 burst out of the cells, and was reabsorbed when the cells were darkened again; that a large part of the pressure changes observed in 1923 in light and in dark were outbursts and inbursts of CO_2 and that only a fraction (one-third to one-half) could have been due to photosynthesis; and that the assimilatory quotient, $\gamma = CO_2$ exchanged/O_2 exchanged, was not approximately minus one (-0.91) as determined by gas analysis in 1923 for experimental periods of several hours, but that its real value must have approached $+4$. Therefore, the real minimum quantum requirement of photosynthesis must have been not 4 but nearer 12, and the real maximum efficiency not 65% but nearer 22%. This allegation seemed to have been further confirmed by experiments performed not in acid medium as in 1923 but at pH 9 in carbonate buffer; this kept the pressure of CO_2 invariant and therefore manometrically avoided the supposed errors caused by the outburst and inburst of CO_2. In such nonphysiological buffers, which had been introduced in 1918[1] for simplification of certain types of experiments, but avoided for determinations of maximum efficiency, quantum requirements of 10—12 per molecule of O_2 were reported[5].

However, the proposed "CO_2 outburst", at variance with the experience of the previous century and a half, was never actually demonstrated in published experiments involving quantum yield measurements. In the only completely detailed efficiency experiment in which the light-dark time course was reported[4 (p. 821)], calculations, not performed by the authors, show that the pressure changes for

the second 5-minute periods of illumination were actually more positive (less negative) than for the first 5-minute periods (— 1.86 for the second period compared with — 2.17 for the first; + 0.11 for the second period compared with — 2.13 for the first). This result, offered as a typical experimental example, was a direct contradiction of an outburst and of[4 (Fig. 2)] provided to illustrate an initial pressure burst graphically. In a later paper[5], in which identification of the pressure burst with a burst of CO_2 was attempted, the only data again available[5 (Figs. 2 and 3)] were obtained by the two-vessel method in which the two vessels were studied not simultaneously but 5 hours apart, and the vessel-constant data necessary to calculate cmm O_2 and CO_2 from pressure changes were unfortunately not supplied so that it is not possible for the reader to check the calculations independently or to arrive at an estimate of the error involved; the latter ordinarily may be shown to become large as values of γ approach — 0.5 to 0, and extremely large for positive values (0 to + 4).

2. Later Experiments

In 1945[6] the assimilatory quotient $\gamma = CO_2/O_2$ was redetermined for *Chlorella* suspended in acid culture medium, but this time the manometric instead of the gas analysis method was employed, and the illumination periods were of the order of 10 min., not hours. Again a γ value of about minus one (— 0.93) was obtained.

A new series of efficiency determinations was then carried out with the method of 1923, but this time with different volumes of fluid and gas phases in the vessels. While the relation, v_F/v_G = volume of fluid/volume of gas, had been 2.24 in 1923, this time it was 1.24. Again an average quantum requirement of 4 was obtained, when again the experiments were computed with a γ value of — 0.9. According to the principle of the two-vessel method[7], the same quantum requirement could not have been obtained in 1923 and 1945, if the true γ value had differed markedly from minus one.

At the end of 1948, a few two-vessel efficiency experiments were carried out by us at the Botany Laboratory of the University of Illinois, Urbana, through the courtesy of Dr. Robert Emerson, with cultures of *Chlorella* provided by him. The cells, when washed in fresh acid culture medium and strongly illuminated with an incandescent lamp, produced O_2 like normal cells, *i.e.*, the Blackman reaction was normal. But at low-light intensities of red light, where the photochemical reaction was the limiting reaction, the O_2 production was at first often small or zero, or even negative (O_2 being absorbed in light instead of being produced). Evidently the photochemical reaction was abnormally ineffective, or some photoöxidation process was superimposed. After a time, when the cells had been shaken for many hours in the fresh acid culture medium, the photochemical reactivity often recovered. On 3 of 10 days when experiments were carried out, quantum requirements of 4—6/molecule of O_2 produced or CO_2 consumed were obtained after long "latent" periods.

Such experiments left little doubt that quantum requirements as low as 4—6/molecule of O_2 produced or CO_2 consumed were experimentally observable by the

two-vessel method under favorable conditions. But the irregular behavior of the cells employed, especially their long latent periods, seemed to us so unsatisfactory that we decided to reinvestigate from the beginning the problem of the efficiency of photosynthesis.

While our new investigation was proceeding in Bethesda in early 1949, a series of papers on the efficiency problem appeared in book form in "Photosynthesis in Plants"[8]. The results reported in this volume seemed to be conclusive and final: with three different and independent methods—manometric, polarographic, and calorimetric—minimum quantum requirements of 10—12/molecule of O_2 produced were obtained.

New Experiments

1. Cultivation of Chlorella

A strain of *Chlorella pyrenoidosa*, isolated and identified many years ago by Dr. Florence Meier of the Smithsonian Institution, was cultivated in Drechsel gas washing bottles containing 200 ml. of the following salt solution: 5 g. $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 2.5 g. KNO_3, 2.5 g. KH_2PO_4, 2 g. NaCl, and 5 mg. $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ containing Zn impurity, in 1 l. of filtered unsterilized well water (pH of the solution 4.5—5.0). The cultures were maintained at room temperatures of 25—30 C. and were aerated with 5% CO_2 in air at a rate of about 500 cc. gas/min., rapid enough to prevent cell sedimentation, and were constantly illuminated with a 100-watt incandescent lamp at a distance of about 30 cm. The inoculum was 100 cu. mm., sometimes even 200 cu. mm., of cells per flask. When after a few days the cells had multiplied to 600—800 cu. mm., they were washed in fresh culture medium in a No. 2 International Centrifuge at the lowest speed giving nearly complete settling in about 10 min., and were then either reinoculated or used for efficiency determinations. Bacterial growth was found to be negligible, due to the acid reaction, the lack of added organic matter — in the salt solution, and possibly antibiotics produced by the *Chlorella*.

Cultivated by this method, used for many years by one of us (D. B.), the *Chlorella* had a relatively stable respiration and gave high photosynthetic efficiencies. The main drawback of the old culture method[1] was very likely the cell sedimentation, which unfortunately was praised as an advantage in 1922 and was therefore favored by later investigators. In the course of the years the tall Erlenmeyer flasks originally employed became broader, and the aeration became so slow that the greater part of the cells sedimented and suffered in the sediments from lack of oxygen*, carbon dioxide, and light.

There still remains the question as to the seeming superiority of well water over distilled water. Thus far, high photochemical efficiencies have been reported only for *Chlorella* cultivated with tap, well, or lake water, the active substances of which, if any, must be widely distributed, since equally efficient yields have been obtained with waters from Berlin, Liebenberg, Bethesda, and Woods Hole. It is probably safer, for the present, and in the absence of specific investigation, to continue with the use of well or natural waters for the cultures.

2. Intermittency of Illumination

When *Chlorella* in optically thin suspensions is illuminated with increasing light intensities, the rate of O_2 production at first increases proportionally to the light intensity, then increases more slowly, and finally, at "saturation intensity", be-

* In a recent paper[9] on the culture of *Chlorella*, carried out by the methods of 1922, damage from lack of oxygen was cited as being due to nitrite poisoning. This is not true generally, but only when the salt medium contains free nitric acid[1] (p. 385).

comes constant. Thus, with increasing light intensities the efficiency of photosynthesis decreases, owing, as is generally assumed, to the limiting influence of a dark reaction. It has long been considered as a major difficulty of efficiency determinations, that the maximum efficiency can only be obtained at very low light intensities; this maximum has to be computed from small pressure changes that involve important "corrections for respiration". It will be shown in the following that this difficulty may be overcome by taking advantage of intermittent illumination with high light intensities.

In the steady state at light saturation, our *Chlorella* produces about 30 times its own cell volume of oxygen gas/hr. at 20 C.; and in the region of proportional intensities it produces several times its cell volume of O_2/hr. As earlier indicated[11, 12], *Chlorella* and most plants may commonly show a rectangularly hyperbolic function of rate of photosynthesis against light intensity, which means virtual proportionality up to at least 20—30% of maximum rate under favorable conditions[1] (pp. 289, 329).

The *Chlorella* suspensions used for our efficiency determinations were not optically thin, but so dense that the red light was virtually completely absorbed in the suspensions. For example, 300 cu. mm. of cells suspended in 7 ml. of culture medium, were placed in shaken rectangular vessels of 8 cm.^{2} bottom area. Imagine now a device whereby the 300-cu. mm. cells could be homogeneously illuminated as in optically thin suspensions, then the 300-cu. mm. cells at saturation intensity would produce $30 \times 300 = 9000$ cu. mm. of O_2 gas/hr., and hence at proportional intensities, at the very least, 1000 cu. mm. O_2 gas/hr. This means that maximum efficiencies could be determined at light intensities that produced as much as 1000 cu. mm. of O_2/hr.

This is not the case, when the cell suspension is at rest during the illumination. Then the cells in the outer layers of the suspension are more strongly illuminated than in the inner layers and the oxygen production is unequally distributed over the 300-cu. mm. cells. The cells in the inner layers might produce no O_2 at all, and some cells in the outer layers would produce much more O_2 than three times their cell volume per hour. Thus in the outer layers the rate of O_2 production may be less than proportional to the light intensity, and the efficiency, determined for the total cell suspension, could not be the maximum efficiency.

But when the cell suspension is shaken and the cells move in cycles from higher to lower intensities and vice versa, then in a time that is large compared with the duration of a 1-cell cycle, all of the 300-cu. mm. cells may absorb the same amount of light, and produce, proportional to the light intensity, the same amount of oxygen. In this state the maximum efficency can be obtained.

To reach this state the motion of the cells must be so rapid that the light energy absorbed in any fraction of time in any part of the cell suspension does not diminish the concentrations of the limiting dark reactions. The more a given total light intensity is concentrated in space and the stronger the spectral region of the light is absorbed by the cells, the smaller will be the illuminated space inside the cell suspension, and the more rapid therefore must be the shaking to distribute the light evenly over the cells of the suspension.

For example, when a narrow beam of red light was sent into a suspension of 300-cu. mm. cells, maximum efficiency was obtained in one instance up to an O_2 production of 70 cu. mm./hr., but less than maximum efficiency was obtained when the light intensity of the narrow beam was doubled, the motion of the cells being insufficient for the higher light intensity. When on the other hand the greater part of the cell suspension was illuminated with diffuse white light, maximum efficiency was obtained from the initial beam of red light up to an over-all O_2 production of 500 cu. mm./hr. as effected by both light sources. This approached an oxygen production of two times the cell volume per hour, a value up to which proportionality to the light intensity may be readily observed in the steady state in experiments with optically thin suspensions.

These facts suggest that the efficieny of photosynthesis should be determined by illuminating cell suspensions from all sides in diffuse light of a spectral region that is only weakly absorbed by the cells. But even with the help of the new actinometric technique[13], this procedure would not allow a correct measurement of the absorbed light. Only when a collimated narrow light beam enters the cell suspen-

sion, and the spectral region is strongly absorbed by the cells, is a correct measurement possible. Thus, as a compromise, diffuse white light whose intensity was not measured was used to compensate or overcompensate the respiration, and then we measured the efficiency of additional photosynthesis induced by a relatively narrow beam of red light of measured intensity.

This section may be concluded with an equation that clarifies the advantageous nature of the intermittency of the illumination in rapidly shaken, dense cell suspensions. If cells are illuminated *continuously* by light of the intensity i_0, $\left[\frac{\text{quanta}}{\text{minutes} \cdot \text{cm.}^2}\right]$, then the equivalent *intermittent* intensity i_x is given by the equation

$$i_0 = i_x \frac{\Delta t_1}{\Delta t_1 + \Delta t_2}, \qquad [3]$$

where Δt_1 is the time of illumination and Δt_2 is the time of darkness. $\frac{\Delta t_1}{\Delta t_1 + \Delta t_2}$ may be called the "intermittency factor". It is the fraction of time the cells are illuminated in a rapidly shaken dense cell suspension. It is an oversimplification, of course, to assume that a given cell alternates only between the full incident intensity i_x and complete darkness, whereas all the intermediate intensities actually occur.

The intermittency factor is the smaller, the smaller the illuminated volume v_{light} of the cell suspension and the greater the dark volume v_{dark} of the cell suspension. Approximately,

$$\frac{\Delta t_1}{\Delta t_1 + \Delta t_2} = \frac{v_{\text{light}}}{v_{\text{light}} + v_{\text{dark}}}, \qquad [4]$$

and when we insert [4] in [3] we obtain

$$i_0 = i_x \times \frac{v_{\text{light}}}{v_{\text{light}} + v_{\text{dark}}} \qquad [5]$$

an equation which allows one to estimate i_x, approximately, from magnitudes that can all be easily determined experimentally.

3. Compensating Light Intensity

Chlorella in optically thin suspensions may be illuminated with such a light intensity (which depends upon the temperature of the cells and the wavelength of the light) that the O_2 production of photosynthesis equals the O_2 consumption of respiration. This is the "compensating" light intensity for O_2. The same light intensity compensates the CO_2 production of respiration only if the respiratory and the assimilatory quotients, CO_2/O_2 are equal. As a rule they are not exactly equal and so the compensating light intensities for O_2 and CO_2 are not exactly equal. This can easily be demonstrated in experiments with the twovessel method. When the pressure change in one vessel is brought to zero by a certain light intensity, the pressure change in the other vessel is as a rule not brought to zero, but may be either somewhat positive or negative. Generally "compensating intensity" in the following means compensating intensity with respect to O_2.

If the O_2 consumption of a dense cell suspension is compensated by light, it is possible that in a part of the cells respiration is overcompensated and in another part undercompensated. But if the suspension is so rapidly shaken that the incident light intensity is evenly distributed over all the cells, then when no O_2 enters or leaves the cell suspension as a whole, no O_2 enters or leaves any cell in any part of the suspension. This state is therefore a state of true, not of apparent compen-

sation, and is explained by Eq. 3, where i_0 is the compensating light intensity for thin cell suspensions.

4. Mechanism of Compensation

Compensation of respiration by light has been generally explained by the O_2 production of photosynthesis. But again and again in the history of the science of photosynthesis the question has been discussed as to whether light did not inhibit the very process of respiration itself, for example, by catalytically inactivating respiratory enzymes or by reducing intermediates of respiration[14]. We have investigated this problem by the following type of experimental procedure:

In a rectangular vessel, bearing two side-arms, was placed 300 cu. mm. of *Chlorella*, suspended in 6 ml. of acid culture medium of pH 4.9. The side-arms contained NaOH, the gas-space air. The suspension was illuminated by a beam of red light (630—660 mμ) which entered the cell suspension in a vertical direction through the bottom of the vessel. The total intensity of the beam was about 0.25 microeinsteins/min., and the cross section of the beam at the bottom of the vessel was 3 cm.^{2} The main part of the light was absorbed in the first millimeter depth of the suspension, so that the illuminated volume of the cell suspension was only 0.3 cu. mm. or 0.05 of the total volume of the cell suspension.

When the vessel was shaken rapidly, no compensatory effect of the light was observed, that is, the negative pressure changes in the light and in the dark were virtually equal. When on the other hand the gas space contained 5% CO_2, everything else being equal, quantum requirements of 3 to 5 were obtained for aliquots of the same cell suspension. Such experiments, many times repeated with the same result, proved that light does not inhibit respiration, when employed at intensities capable of giving maximum photosynthetic efficiencies; such light, when it compensates respiration, does so by photosynthesis, the gas exchange of which happens to be the reverse of the gas exchange of respiration.

This result does not contradict earlier observations that in the near absence of CO_2 in the gas space, light can compensate respiration. The light intensities then employed were much higher and were not controlled by simultaneous efficiency determinations. Moreover, in the present experiments we had the advantage of adequate intermittent illumination. In their cycles from dark to light and vice versa the cells had time to give off in the longer dark periods most of the CO_2 produced in their respiration, and when they entered the illuminated volume of the cell suspension they were relatively free of CO_2. Thus in the competition between light and alkali for the CO_2 produced in respiration, our special set-up worked in favor of the alkali.

5. The Significance of Compensation

Cultivated as described, *Chlorella* has shown under experimental conditions at 20^0 an initial respiration of 0.5 to 1.2 times its own volume of O_2 gas/hr. After long manometric experiments values as low as 0.2 times the cell volume of O_2 gas/hr. have been observed. Thus very different rates of photosynthesis may be necessary to compensate respiration and the "compensating light intensity" is a highly variable magnitude.

Compensation of respiration is important for the following reasons:

1. When photosynthetic efficiencies were determined manometrically below the compensation point by a sequence of dark and light periods, the experiments had to be discontinued after some hours, because not only the respiration, but also the efficiency of photosynthesis usually decreased. But when the respiration was overcompensated, so that the pressure changes throughout the whole duration of the

experiment were definitely positive, then the efficiency of photosynthesis remained constant for even more than 24 hr. Compensation of respiration therefore made long experiments possible.

2. Compensation does not eliminate respiration chemically; but it eliminates respiration manometrically, and thus removes many of the difficulties of efficiency determinations. Positive pressure changes can be produced in the desired range. They are more constant than negative pressure changes and when the light actions are obtained as differences of two positive pressure changes at two intensities, the accuracy of the manometric method is improved.

3. Although it has been shown that light does not inhibit respiration, the theoretical possibility still remained that the process of photosynthesis might inhibit respiration. Thus the old problem, of whether respiration in the dark and during photosynthesis is the same, was still important in experiments below the compensation point. But the problem no longer exists when efficiencies are determined as differences of two positive pressure changes at two light intensities. For then, at the lower intensity photosynthesis has already had occasion to interfere with respiration, leaving no further respiration for the higher intensity to interfere with.

4. Thermodynamically, efficiency determinations below the compensation point were uncertain because below this point chemical energy is not gained, but only the loss of chemical energy is inhibited. But when in experiments above the compensation point we obtain the same quantum requirement as below this point, it is proved that one molecule of O_2 produced or one less molecule of O_2 consumed are thermodynamically equivalent.

5. Let us consider a *Chlorella* suspension to be a machine that transforms light energy into chemical energy. The maintenance of this machine requires an expenditure of energy that is defrayed by respiration and amounts to 112,000 cal./mole of O_2 consumed. If we substract this amount from our gain of energy, we obtain what may be termed the "economic efficiency," E', as distinguished from the "thermodynamic efficiency," E.

When, for example, the quantum requirement is 4, the thermodynamic efficiency in red light is

$$E = \frac{112{,}000}{4 \cdot 43{,}000} \times 100 = 65\%,$$

but the economic efficiency is

$$E' = E \times \frac{f - 1}{f},$$

where f is the "compensation factor",

$$f = \frac{\text{oxygen developed in light}}{\text{oxygen consumed in the dark}}.$$

At the compensation point we have $f = 1$, and therefore $E' = 0$.

At 6 times the compensation point ($f = 6$), where we still obtain a thermodynamic efficiency of 65%, the economic efficiency is

$$E' = 65 \frac{f - 1}{f} = 65 \times \frac{5}{6} = 54\%.$$

At 10 times the compensation point ($f = 10$), if the thermodynamic efficiency were still 65%, the economic efficiency would be

$$E' = 65 \frac{f - 1}{f} = 65 \times \frac{9}{10} = 59\%.$$

Thus by experiments above the compensation point it can be shown that the economic efficiency of photosynthesis is high, even when the energy spent by nature for the maintenance of the energy-transforming machine is subtracted from the thermodynamic gain.

6. The idea has recently been discussed that nature may possibly utilize the energy of respiration by diverting it in the light to photosynthesis, away from functions it has in the dark[14]. If so, then the efficiencies computed for the absorbed light energy should be different at different degrees of compensation. When respiration is compensated sixfold, it could contribute to the production of 1 mole of O_2 only 112,000/6 = 18,000 cal., that is, about 11% of the absorbed light energy of 4 quanta of red light. But when respiration is but once compensated, it could contribute about 65% of the absorbed light energy. The fact that the same efficiencies of light are observed for uncompensated as for sixfold compensated cells seems to preclude the possibility that the energy of respiration contributes significantly to photosynthesis.

The foregoing discussion shows how firm has become the foundation for the new efficiency determinations based on experiments above the compensation point. Most objections, procedural as well as theoretical, that have been raised concerning high photosynthetic efficiencies since 1923, have in one way or another centered around respiration. By compensating it, these objections have lost not only their quantitative significance but even their qualitative meaning.

6. The Two-Vessel Method

By the two-vessel method, introduced in 1924 [7], the O_2 exchange as well as the CO_2 exchange of cells can be determined manometrically in the presence of indefinitely high pressures of CO_2. Equal amounts of cells are placed in two vessels, in each of which v_F/v_G, the ratio of the volume of the liquid phase to that of the gas phase, is different. Then the same gas exchange produces different pressure changes in the two vessels and from these different pressure changes the quotient $\gamma = CO_2/O_2$ and the gas exchanges x_{O_2} and x_{CO_2} may be calculated.

It is a necessary condition of this method that the gas exchange of the cells in the two vessels be exactly the same for the whole duration of an experiment. But owing to the principle of the method there must be differences of volume in the two vessels. It is an important question whether these differences of volum can possibly induce secondary differences in the gas exchanges of the cells in the two vessels, during the course of an experiment.

When in two vessels, with equal amounts of cells, 5 and 7 ml. of liquid are placed, the total volume of each of the two vessels being 14 ml., v_F/v_G in the one vessel is 0.56 and in the other 1.0. This is an appropriate methodological difference. However, the concentration of the cells are different. The rate of the intermittency cycles of the cells in the two vessels could be different and so therefore the light actions could be different. In the course of long experiments autoinhibition of the cells might conceivably occur and cause different decreases in the gas exchanges in the two vessels.

Such sources of error are avoided when the volumes of the liquid phases are made equal. Then the total volumes of the vessels must be different to obtain the necessary differences in v_F/v_G. For example, 18 and 14 ml. total volume and 7 ml. of liquid volume is an appropriate arrangement, v_F/v_G being in the one vessel 0.64 and in the other 1.0. But then the gas exchange of the cells produces different partial pressures of CO_2 in the two vessels, with conceivable consequences on the cell metabolism. We prefer this inequality to the inequalities of cell concentrations, be-

cause inequalities of CO_2 pressures, which have yet to be shown to have effects over wide ranges of variation, can easily be readjusted by regassing. Thus, the greater part of our efficiency determinations have been carried out with equal liquid and different gas volumes.

Another source of error is the differential time factor which may occur if the pressure changes produced by light in the two vessels are not observed simultaneously (an exaggerated instance of this was previously discussed in *Early Experiments* with respect to Ref.5). The ideal would be to illuminate the two vessels simultaneously* by two light beams, identical not only in total intensity, but also in geometrical design. We did not have such a pair of beams at our disposal and so we illuminated the two vessels one after another closely together in point of time. We illuminated in periods of usually 10 min., by moving one light beam from one vessel to the other and vice versa and taking the readings for both vessels simultaneously. When this alternation was repeated many times we obtained for every vessel a series of dark values and of light values, or of light values of the intensities i_0 and $i + \Delta i$; and when for each vessel all the dark values were summed up and likewise all the light values, the time factor was virtually eliminated and the pressure changes in the two vessels were obtained essentially simultaneously.

7. *The Equations of the Two-Vessel Method*

These equations, derived in 1924[7], are adapted here to the special purposes of photosynthesis. Because the experiments with compensated respiration play so important a role in this work, the equations are presented not for a sequence of darkness and illumination, but for a sequence of two illuminations with two different light intensities, one of which may approach zero as a limit. When the lower light intensity is zero, then the equations hold true for the ordinary sequence of darkness and illumination. The light intensities are denoted as $\mathcal{J}$ and $\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}$. They have the units of quanta/min. and are related to i by the equation

$$\mathcal{J} = i \times \text{cm.}^2 \text{ (quanta/min.)}.$$

Let both vessels be illuminated first with an intensity $\mathcal{J}$ and then with an intensity $\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}$; and let the pressure changes be h_J and $h_{J+\Delta J}$ for vessel I, and h'_J and $h'_{J+\Delta J}$ for vessel II. Then when the pressure changes are observed for equal time periods, and when the two vessels contain the same amount of cells, the gas exchanges x_{O_2} and x_{CO_2}, which are equal in the two vessels, can be calculated by the equations:

$$(x_{O_2})_J = \frac{h_J \times k_{CO_2} - h'_J \times k'_{CO_2}}{k_{CO_2}/k_{O_2} - k'_{CO_2}/k'_{O_2}} \qquad [6]$$

$$(x_{CO_2})_J = \frac{h_J \times k_{O_2} - h'_J \times k'_{O_2}}{k_{O_2}/k_{CO_2} - k'_{O_2}/k'_{CO_2}} \qquad [7]$$

$$(x_{O_2})_{J+\Delta J} = \frac{h_{J+\Delta J} \times k_{CO_2} - h'_{J+\Delta J} \times k'_{CO_2}}{k_{CO_2}/k_{O_2} - k'_{CO_2}/k'_{O_2}} \qquad [6a]$$

$$(x_{CO_2})_{J+\Delta J} = \frac{h_{J+\Delta J} \times k_{O_2} - h'_{J+\Delta J} \times k'_{O_2}}{k_{O_2}/k_{CO_2} - k'_{O_2}/k'_{CO_2}}, \qquad [7a]$$

where k_{O_2} and k_{CO_2} are the simple vessel constants, no prime mark for vessel I and a prime mark for vessel II. All h values are positive when the light intensity $\mathcal{J}$ overcompensates respiration. All h values are usually negative when $\mathcal{J} = 0$, except at high $\Delta\mathcal{J}$ values.

From Eqs. [6], [7], [6a], and [7a] we can calculate the action of the light increment $\Delta\mathcal{J}$, if we assume that the gas exchange measured at the intensity $\mathcal{J}$ continues during the illumination with the intensity $\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}$. Then we may subtract [6] from [6a] and [7] from [7a] and obtain:

$$(x_{O_2})_{J+\Delta J} - (x_{O_2})_J = \frac{(h_{J+\Delta J} - h_J) \times k_{CO_2} - (h'_{J+\Delta J} - h'_J) \times k'_{CO_2}}{k_{CO_2}/k_{O_2} - k'_{CO_2}/k'_{O_2}} \qquad [8]$$

* *Zusatz 1961.* Vergleiche Arbeit 11 dieses Buchs, wo die gleichzeitige Belichtung der beiden Gefäße durch einen geteilten Lichtstrahl beschrieben ist.

$$(x_{CO_2})_{J+\Delta J} - (x_{CO_2})_J = \frac{(h_{J+\Delta J} - h_J) \times k_{O_2} - (h'_{J+\Delta J} - h'_J) \times k'_{O_2}}{k_{O_2}/k_{CO_2} - k'_{O_2}/k'_{CO_2}} \quad [9]$$

and if we write

$$y_{O_2} = (x_{O_2})_{J+\Delta J} - (x_{O_2})_J$$
$$y_{CO_2} = (x_{CO_2})_{J+\Delta J} - (x_{CO_2})_J$$
$$H = h_{J+\Delta J} - h_J$$
$$H' = h'_{J+\Delta J} - h'_J$$

we obtain instead of [8] and [9]

$$y_{O_2} = \frac{H \times k_{CO_2} - H'k'_{CO_2}}{k_{CO_2}/k_{O_2} - k'_{CO_2}/k'_{O_2}} \quad [10]$$

$$y_{CO_2} = \frac{H \times k_{O_2} - H' \times k'_{O_2}}{k_{O_2}/k_{CO_2} - k'_{C_2}/k'_{CO_2}} \quad [11]$$

where y_{O_2} and y_{CO_2} are the gas exchanges effected by the light increment ΔJ.

There can be little doubt that when the increment ΔJ is added to a high overcompensating intensity J the action of J continues. One might have been more doubtful for the case where ΔJ is added to dark cells ($J = 0$). But since the same efficiencies have been obtained for ΔJ whether J was quite large or zero, the validity of eqs. 10 and 11 is proved.

8. *The Light and Its Absorption*

A Steinheil glass 3-prism spectrograph, operated with a focal length of 195 mm. at $f/3.5$ for the collimator and a focal length of 710 mm. for the telescope was used as a monochromator. The slit was illuminated with a 750-w. projection lamp. The image of the coiled filament at about 20° to its plane was projected onto the slit with an auxiliary lens. A 1000-w. voltage regulator was used to supply power to the lamp, which operated at constant current.

The width of the entrance slit was about 2 mm., corresponding to about 20 mμ in the red region. A slit was placed in the focal plane of the telescope and was adjusted to have a width of about 30 mμ covering the region 630—660 mμ. A lens was placed behind this slit to throw, in a weakly convergent beam, an image of the exit prism face on the bottom of the manometer vessel.

The area of the beam at the vessel was about 3 cm.^{2} and the energy flux was about 0.6 microeinsteins/min., or in terms of the actinometer 13.4 cu. mm. of O_2 absorbed/min. This intensity was decreased when desired by placing in the light beam just before the exit slit blackened wire screens calibrated by the National Bureau of Standards.

The beam of red light entered the manometer vessel in a vertical direction from below and was completely absorbed in the cell suspension. Its incident intensity, which therefore was also the absorbed intensity, was measured actinometrically, and is denoted in the following experiments as ΔJ.

A second light source was a 100-w. incandescent lamp, kept constant by a 500-w. voltage regulator. The lamp was mounted above the thermostat symmetrically to the two vessels and could be moved vertically to produce the desired state of compensation or overcompensation in the cells. The total absorbed intensity of this light is denoted in all experiments as J. It was not measured,* because efficiencies were only calculated for the increment ΔJ and thus the action of j was eliminated.

Attention may be called to the different volumes of cells which absorbed the measured red light from below and the unmeasured white light diffusely (mainly from above and the side, also some from below due to reflection back from the tank bottom). When 300 cu. mm. of *Chlorella*, suspended in 7 ml. of liquid, was placed in a rectangular vessel of 8 cm.^{2} bottom area, as in most of our efficiency determinations, then the red light ΔJ was absorbed in a volume of about $3 \times 0.1 = 0.3$ cc. On the other hand, the white light was absorbed in the greater part of the cell suspension, because the white light entered the cell suspension through a greater surface and was on the average less absorbed by the cells because of the shorter wavelengths also involved.

In a discussion (Society of General Physiology, Woods Hole, June 22, 1949) the question was raised as to whether the white light from the lamp above possibly did

* One must be warned against measuring J actinometrically, J may contain a spectral region that is absorbed by the chlorophyll in the cells, but not by ethylchlorophyllide dissolved in pyridine. Other spectral regions are not absorbed completely owing to the incident angles of the white light.

not materially reach the lowest layers of the cell suspensions, so that the measured red light from below was absorbed in a cell layer of noncompensated respiration, and hence the efficiency calculated for the light increment ΔJ was possibly still the efficiency of an inhibition of respiration. Although this question, owing to the rapid motion of the cells, had to be answered in the negative, it has been tested experimentally as a result of the discussion. Respiration was also compensated mainly from below, instead of from above, by white light filtered through a red filter that transmitted wavelengths longer than 560 mμ. This time the increment of measured red light from below was definitely absorbed by the very cells whose respiration was overcompensated. The same efficiencies for the increment ΔJ were obtained when the compensation was effected by light from below as from above.

In the same discussion objections were raised against the procedure of complete absorption, and experiments with optically thin cell suspensions were suggested. But the methods used to measure light absorption in turbid media seem to be still unsatisfactorily developed in connection with manometry.* It may be remembered that 10 years ago Noddack and coworkers[15–19] determined quantum requirements of thin suspensions of *Chlorella* that absorbed only about 10% of the incident light. But Noddack observed quantum requirements of 4 in carbonate buffer, which suggests, according to our knowledge of today, that his light absorption measurements were possibly in error by more than 100%, unless his cultures, which were maintained in an unusual manner, had actually become adapted to give high efficiencies in carbonate buffer.

The only serious objection raised against complete absorption was too high a respiration. But since efficiencies are determined with compensated respiration, this objection is no longer valid.

9. The Measurement of the Quantum Intensities

Light measurements were carried out manometrically as described in 1949[13]. Two hundred mg. of thiourea and 3 mg. of ethyl chlorophyllide,** dissolved in 7 ml. pyridine, were placed in a rectangular vessel of about 8 cm.^{2} bottom area, with O_2 in the gas phase. A beam of red light of 630—660 mμ and of a cross section of 3 cm.^{2} entered the solution in a vertical direction through the bottom of the vessel and was completely absorbed in the solution. With an adequate rate of shaking, the O_2 consumption of the solution was proportional to the light intensity and did not increase with increasing shaking rates.

Let the decrease in O_2 pressure in the actinometer be h mm. in t minutes of illumination and let k_{O_2} (mm^2 be the vessel constant for oxygen in pyridine $\alpha_{O_2}^{20^\circ} = 0.092$), then the total intensity ΔJ of the light beam is obtained by the equation:

$$\Delta J = h\, k_{O_2}/22.4\, t \text{ (}\mu\text{mole quanta/min.)} \qquad [12]$$

where 22.4 is the volume of one μmole of gas in cu. mm. The quantum intensity was usually determined at the order of magnitude of about 1 μmole/10 min. (*i.e.*, 22.4 cu. mm./10 min.), as arranged by the use of suitable neutral screens.

Because our application does not require the conversion of cu. mm. of O_2 to μmoles of quanta, we may express the light intensities most simply by the cu. mm. of O_2 absorbed/min. in the actinometer

$$\Delta J = h\, k_{O_2}/t \text{ (mm}^3\text{ O}_2\text{/min.)} \qquad [13]$$

* *Zusatz 1961.* Vergleiche Arbeit Nr. 25 dieses Buchs, wo die Anwendung der Ulbrichtschen Kugel für Absorptionsmessungen in Chlorella beschrieben ist.

** The crystallized ethylchlorophyllide was prepared by WALTER CHRISTIAN of the Kaiser Wilhelm Institute at Berlin-Dahlem. Chlorophyll itself was not used owing to the foaming of the preparation at hand in pyridine.

10. The Measurement of Quantum Requirements

In each of two rectangular vessels of unequal total volume, bearing capillary vents, were placed 300 cu. mm. of *Chlorella*, suspended in 7 ml. of culture medium at pH 4.9—5.1. The vessels were connected to simple Haldane-Barcroft blood-gas manometers (capillary diameter 0.8 mm.) and aerated in the thermostat, usually at 20C., with 5% CO_2 in air, with a low shaking rate at first. The shaking motion was horizontal with an excursion of 2 cm. After equilibration was reached and the vents closed, the shaking was speeded up to 150/min. and some 15 min. later the first manometric readings were taken. Foaming never occurred, even in experiments of more than 24 hr. duration. Splashing occurred only when by accident a manometer was too loosely fastened and jerked suddenly during horizontal motion.

In all experiments the measured light, the light increment $\Delta\mathcal{J}$, was of the spectral region 630—660 mμ, isolated by the monochromator. The beam of this red light entered the thermostat in a horizontal direction through a lateral double glass window (Thermopane, to eliminate moisture condensation), and was reflected by a 45 mirror vertically into a manometer vessel. The mirror could be moved horizontally in the thermostat, reflecting the light alternately into the one or the other vessel. In both positions of the mirror the intensities of the light beam at the bottoms of the vessels were sufficiently equal, if the water in the thermostat was clean. Small inequalities were eliminated, if necessary, by interchanging the positions of the manometers.

The subsequent procedure was different depending on whether the experiments were carried out with uncompensated or compensated respiration. In all experiments with uncompensated respiration the mirror was shifted, and thus the gas exchange in both vessels was obtained without interruption, the one vessel being in the dark when the other was in the light. The periods of dark and light varied in these experiments from 5—60 min. and the duration of the entire experiments did not exceed several hours after which the light action usually began to decrease along with the respiration. Owing to the rapid shaking, physical manometric transition effects of equilibration were not ordinarily observed when dark cells were illuminated, and vice versa, even when the readings were taken every 1 or 2 instead of 5 or 10 min.

In the experiments with compensated respiration the method of shifting the mirror was not usually applied. In a thermostat diffusely illuminated by the compensating white light, shifting of the mirror could alter the distribution of the white light, and the two vessels even if equally illuminated by $\mathcal{J}$ before the shifting might not be after a shifting. Thus only one position in the thermostat could be used for the measurement of the $\Delta\mathcal{J}$ light action, if essentially equal $\mathcal{J}$ values for each vessel were desired.* Hence, first one vessel was illuminated alternately with the intensities $\mathcal{J}$ and $\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}$, and in succession the second vessel was brought to the same position and illuminated in the same manner. In the meantime the vessel not receiving $\Delta\mathcal{J}$ was shaken in compensating white light ($\mathcal{J}$), but not necessarily read manometrically. These experiments with compensated or overcompensated respiration could be extended for a long time without decrease of efficiency. If after 24 hr. of continuous shaking and illuminating with $\mathcal{J}$ the efficiency began to decrease, transfer of the cells to fresh culture medium raised the efficiency again to the initial value.

When in the efficiency experiments, with or without compensated respiration, the light intensity $\Delta\mathcal{J}$ effected in t minutes the pressure changes H in the one vessel and H' in the other, y_{O_2} and y_{CO_2}, the gas exchanges effected by $\Delta\mathcal{J} \times t$ were calculated from H and H' by eqs. 9 and 10 and obtained in cu. mm. of gas. $\Delta\mathcal{J}$ was then determined manometrically. The manometer vessels, containing the cell suspension, were replaced by a similar vessel containing, instead of the 7 ml. of cell suspension, 7 ml. of the actinometric solution. Two such vessels may be used, the one to be placed in the red light beam and the other as a control in the "dark." When in t minutes of illumination $\Delta\mathcal{J}$ effected the pressure change h, $\Delta\mathcal{J}$ was calculated by Eq. 12 and obtained in cu. mm. of O_2/min.

The quotient of the two oxygen exchanges, computed for the same time, is the quantum requirement per molecule of oxygen:

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{O_2 \text{ absorbed by the actinometer}}{O_2 \text{ produced by the cells}} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times t}{y_{O_2}} \left[\frac{h \cdot v}{O_2}\right]. \qquad [14]$$

* Since experience eventually showed that the action produced by $\Delta\mathcal{J}$ was independent of $\mathcal{J}$ over wide limits, it was not strictly necessary for $\mathcal{J}$ to be equal for both vessels, and in certain types of experiments shifting of the mirror from one vessel to the other was permissible, if distribution of the white light was not significantly altered.

$\frac{1}{\phi}$ is thus obtained by the measurement of three pressure changes. Their magnitudes were in the range of 25-50 mm. With every new experimental arrangement, it must be checked, both for the cell suspension and the actinometer, that the manometric readings are independent of an increase in shaking rate.

With regard to the outburst and inburst of CO_2, inferred during the last 10 years, even if never demonstrated by published data in quantum yield experiments, it may be emphasized that the quantum requirement per molecule of O_2 obtained by Eq. 14 is independent of all alleged fluctuations of CO_2. When from the pressure changes H and H' the gas exchange is computed by Eqs. 10 and 11, y_{O_2} is obtained independent of the CO_2 exchange and y_{CO_2} is obtained independent of the O_2 exchange. Measurement of the O_2 and CO_2 metabolism by the two-vessel method would be improperly understood if it were insisted, as upon occasion it has been, that the O_2 uptake after the interruption of illumination could only be measured after 40 min. of dark, by which time the inburst of carbon dioxide would supposedly be completed. On the contrary, for any period of time, during illumination as well as after illumination, the two-vessel method yields the O_2 exchange independently of all CO_2 fluctuations, providing, of course, that physical equilibration is adequately maintained.

The described procedure for measurement of photosynthetic efficiency represents a very great simplification of the quantum requirement determination procedures described in 1923 that were adopted in part but never *in toto* by later investigators. The special differential manometer, inconvenient to handle, and the cathetometer-microscope, are replaced by simple Haldane-Barcroft blood-gas manometers and by direct observation. The bolometer, with its manifold auxiliary equipment, is replaced by the simplest of all such energy measuring instruments, the manometric actinometer. Finally, especially when the monochromator is replaced by interference or other appropriate filters, quantum requirements of photosynthesis may be performed as simple classroom experiments, and have been[20].

Experimental Details

Our experimental equipment was set up by the middle of March: the Steinheil monochromator; the thermostatted water-bath with Thermopane window, made by the American Instrument Company (Silver Spring, Md.); the manometers and the rectangular vessels manufactured by E. Machlett and Sons (New York City); and culturing arrangements for growing the strain of *Chlorella pyrenoidosa* that was obtained through the courtesy of Dr. F. E. Allison of the Plant Industry Station (Beltsville, Md.). In the very first experiment we obtained a quantum requirement of 3. But it took us about two and a half months to find out the conditions under which high efficiencies could be obtained in every experiment. In these two and a half months we observed quantum requirements of 3 to 6, but also higher requirements, indeed as high as 20. We often observed rapidly decreasing respirations and light actions in experiments with uncompensated respiration, and could calculate by the equations of the two-vessel method a wide range of uncertain yields because the necessary condition of these equations—identity of metabolism in the two vessels—was not yet invariably fulfilled. Only gradually* did we come to clarify and identify the reasons for the irregularities: the sedimentation of the cells in the cultures, the not always adequate shaking of the

* *Zusatz 1961.* Vergleiche hierzu die Arbeiten 27, 28 und 38, durch die das hier diskutierte Problem vollständig gelöst worden ist (Notwendigkeit des blaugrünen Lichts, Züchtung mit fluktuierender Intensität).

manometer vessel, the too few cells in the manometer vessels, the too great time differences between manometric readings of the two vessels where $\mathcal{J} = 0$, the damage done to the cells when shaken too long in the dark, the too high intensity of the measured red-light beam, *etc.* In addition, all our early experiments were carried out at 10°C. (as in 1923) where manometric uncertainties are greater than at 20°C. the temperature finally adopted here.

We therefore decided to report here in detail only experiments performed since May 30th. In these experiments all necessary requirements that we know of were complied with and therefore we felt justified in averaging the results as reported in the *Summary and Conclusions*. Earlier reports of various aspects of the work, with various collaborators, have appeared elsewhere[20, 21, 22]. The present work is based upon a background of a total of more than one hundred experiments of the type illustrated in the ten examples shortly to follow. Many minor aspects of the work, and miscellaneous control experiments, have not been detailed, but brief mention may be made of some as follows: (1) The measured red light beam ($\Delta\mathcal{J}$) when first filtered through the actinometric solution produced no photosynthetic action. (2) The high photosynthetic efficiency was not decreased in vessels containing Pd catalyst in the side-arm to remove H_2 possibly formed. Mass spectrographic analysis of the vessel gas phase at the end of a prolonged experiment (without Pd in side-arm) indicated no significant occurence of H_2 or other unusual gases (oxides of nitrogen, *etc.*) (3) The photosynthetic yield in bicarbonate medium with 5% CO_2 in air, at pH *ca.* 7—7.5, was less (*ca.* 8 quanta/O_2) than in culture medium at pH 5. (4) In an experiment carried out with the cells washed and taken up in distilled water instead of culture medium, but with 5% CO_2 in air as usual (pH 5), the photosynthetic efficiency remained high, indicating that low pH rather than salt composition is the more important prerequisite for high efficiency. (5) For any period that an illuminated manometer was not shaken, a considerable fraction of the photosynthetic activity might be lost; this was tested for stationary periods of 30 sec. and more. Thus, a vessel alternately shaken and halted every 30 sec. (or every 1, 2, or 5 min.) might give during a total elapsed time of 10 min. only about 60—70% of the pressure change shown upon 10 min. continuous shaking; it was not practicable to use periods much shorter than 30 sec., but in this connection rotating sector intermittency experiments are projected.

The letter symbols used in the following description of the experiments signify:

$\mathcal{J}$ — Intensity of the compensating light absorbed per minute in the cell suspension. $\mathcal{J}$ had to be kept constant during an experiment, but was not measured.

$\Delta\mathcal{J}$ — Intensity of the added measured red light, incident and absorbed per minute in the cell suspension, measured actinometrically and expressed as cu. mm. O_2/min.

h_J — Millimeters of observed pressure change in t minutes in vessel I, when $\mathcal{J} \times t$ is absorbed by the cell suspension.

$h_{J+\Delta J}$ — Millimeters of observed pressure change in t minutes in vessel I, when $(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) \times t$ is absorbed by the cell suspension.

H — $h_{J+\Delta J} + h_J$.

h'_J, $h'_{J+\Delta J}$, and H' refer, correspondingly, to vessel II.

k_{O_2} and k_{CO_2} — simple vessel constants (mm.^{2}) for vessel I — $a_{O_2} = 0.03$

k'_{O_2} and k'_{CO_2} — simple vessel constants (mm.^{2}) for vessel II — $a_{CO_2} = 0.87$.

y_{O_2} — Cubic mm. of O_2 produced by the action of $\Delta\mathcal{J} \times t$ in the cell suspension.

y_{CO_2} Cubic mm. of CO_2 produced by the action of $\Delta\mathcal{J} \times t$ in the cell suspension.

$\frac{1}{\Phi}$ quantum requirement per molecule O_2 produced $\left(\frac{h \cdot \nu}{O_2}\right)$.

y_{O_2} and y_{CO_2} were computed by use of Eqs. 10 and 11, $\Delta\mathcal{J}$ by use of Eq. 13, and $\frac{1}{\Phi}$ by use of Eq. 14.

In all experiments the temperature of the thermostat was 20° C. and the spectral region of the added red light of the intensity $\Delta\mathcal{J}$ was 630-660 mμ. $\Delta\mathcal{J}$ should usualla not exceed 6 cu. mm. O_2/min. (0.27 microeinsteins/min.) under our prevailing conditions.

Experiment 1

May 30, 1949

Acid culture medium. 270 cu. mm. of cells in each vessel. 5% CO_2 in air.

$\Delta\mathcal{J} = 5.4$

Vessel No. 5		Vessel No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$
mm.		*mm.*	
10′ dark — 10.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 0.5	10′ dark — 2.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 3.0
10′ dark — 10.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ 0	10′ dark — 3.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 2.0
10′ dark — 9.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 1.5	10′ dark — 2.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 3.5
10′ dark — 8.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ 0	10′ dark — 2.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 3.5
10′ dark — 9.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 1	10′ dark — 0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 3.0
10′ dark — 8.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 1	10′ dark — 1.0	10′ $\Delta\mathcal{J}$ + 5.0
60′ dark — 55.0	60′ $\Delta\mathcal{J}$ + 4.0	60′ dark — 11.5	60′ $\Delta\mathcal{J}$ + 20.0
60′ H'	+ 59 mm.	60′ H	+ 31.5 mm.

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 70.4 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 56.0 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -0.8$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 60}{70.4} = 4.6$$

$\Delta\mathcal{J} = 5.4$

No. 5		No. 3	
Respiration over-compensated		Respiration over-compensated	
5′ $\mathcal{J}$ + 5.0	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 11.5	5′ $\mathcal{J}$ + 6.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 9.0
5′ $\mathcal{J}$ + 6.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 9.5	5′ $\mathcal{J}$ + 6.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 10.0
5′ $\mathcal{J}$ + 6.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 9.5	5′ $\mathcal{J}$ + 7.0	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 8.5
5′ $\mathcal{J}$ + 5.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 13.0		
5′ $\mathcal{J}$ + 7.0	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 15.0		
25′ $\mathcal{J}$ + 30.5	25′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 58.5	15′ $\mathcal{J}$ + 20.0	15′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 27.5
25′ H'	+ 28.0 mm.	25′ H	+ 12.5 mm.

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 46.3 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 47.6 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.03$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 25}{46.3} = 2.9$$

$\Delta\mathcal{J} = 5.4$

No. 5		No. 3	
Respiration more over-compensated		Respiration more over-compensated	
$5'\,\mathcal{J} + 18.5$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 22$	$5'\,\mathcal{J} + 14$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 15.0$
$5'\,\mathcal{J} + 18.0$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 22.5$	$5'\,\mathcal{J} + 14$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 16.5$
$5'\,\mathcal{J} + 16.5$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 22.0$	$5'\,\mathcal{J} + 12.5$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 16.5$
$5'\,\mathcal{J} + 17.5$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 20.5$	$5'\,\mathcal{J} + 14.0$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 14.0$
$5'\,\mathcal{J} + 17.0$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 23.0$	$5'\,\mathcal{J} + 11.5$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 15.0$
		$5'\,\mathcal{J} + 12.0$	$5'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 14.5$
$25'\,\mathcal{J} + 87.5$	$25'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 110$	$30'\,\mathcal{J} + 78$	$30'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 91.5$
$30'\,H' + 27$ mm.		$30'\,H + 13.5$ mm.	

$$\left.\begin{aligned} y_{O_2} &= +\ 36.3 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} &= -\ 32.6 \text{ cu. mm.} \end{aligned}\right\}\ \gamma = -\ 0.9$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 30}{36.3} = 4.5$$

Total duration of the experiment more than 7 hr. The entire experiment was performed with the same cell suspension. The result is that the quantum requirement is the same below and well above the compensation point, within the experimental error.

Experiment 2

June 1, 1949

Comparison of the quantum requirements in acid culture medium, pH 4.9, and 0.1 M carbonate buffer (15 vol. 0.1 M K_2CO_3, 85 vol. 0.1 M $NaHCO_3$) pH 9.2.

Aliquots of the same cell suspension. Two hundred cu. mm. of cells in each vessel. Gas space in the two vessels with culture medium, 5% CO_2 in air; in the vessel with carbonate buffer, air.

The entire experiment with the same cell suspensions in the sequence reported below. $\Delta\mathcal{J} = 5.4$ for all experiments, except the last, where $\Delta\mathcal{J}$ was 2.75.

Vessel No. 7 (pH 9.2)

7 ml. carbonate buffer

$v = 13.824$ $\quad v_F = 7.00$ $\quad k_{O_2} = 0.657$

Respiration compensated

$$\left.\begin{array}{ll} 5'\,\mathcal{J} & 0 \\ 15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) & +\ 11.5 \\ 15'\,\mathcal{J} & 0 \\ 15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) & +\ 11.5 \\ 10'\,\mathcal{J} & -\ 0.5 \end{array}\right\} \begin{array}{ll} 30'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) & +\ 23 \text{ mm.} \\ 30'\,\mathcal{J} & -\ 0.5 \text{ mm.} \\ \hline 30'\,H & +\ 23.5 \text{ mm.} \end{array}$$

$$y_{O_2} = 23.5 \times 0.657 = 15.4 \text{ cu. mm.}$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 30}{15.4} = 10.5$$

No. 5 (pH 5)		No. 3 (pH 5)	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$
$15'\,\mathcal{J} + 15.5$	$15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 29.5$	$15'\,\mathcal{J} + 11$	$15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 17$
$15'\,\mathcal{J} + 17.5$	$15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 29.0$	$15'\,\mathcal{J} + 10.5$	$15'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 16$
$30'\,\mathcal{J} + 33.0$	$30'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 58.5$	$30'\,\mathcal{J} + 21.5$	$30'(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 33$
$30'\,H' + 25.5$		$30'\,H + 11.5$	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 41.3 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 43.0 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.04$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathfrak{J} \times 30}{41.3} = 3.9$$

No. 7 (pH 9.2)

Respiration not compensated

Carbonate buffer

$k_{O_2} = 0.657$

10′ dark — 33.5	
10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 23.5	20′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 46.0
10′ dark — 30.5	20′ dark — 62.7
10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 22.5	
10′ dark — 30.0	20′ H + 16.7
20′ dark — 60.5	

$y_{O_2} = 16.7 \times 0.657 = 11.0$ cm.

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathfrak{J} \times 20}{11} = 9.8$$

No. 5 (pH 5)

$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$
10′ dark — 12	10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 5.0
10′ dark — 13	10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 4.5
	10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 4.0
20′ dark — 25	30′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 13,5
30′ dark — 37.6	
30′ H' + 24.1	

No. 3 (pH 5)

$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$
10′ dark — 4.0	10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 1.5
10′ dark — 5.0	10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 1.5
10′ dark — 5.0	
30′ dark — 14	20′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 3.0
	30′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 4.5
	30′ H + 9.5

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 45.6 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 53.0 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.18$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathfrak{J} \times 30}{45.6} = 3.6$$

No. 7 (pH 9.2)

$k_{O_2} = 0.657$

$\Delta\mathfrak{J} = 2.75$

10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 24	
10′ dark — 28	30′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 71.5
10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 24.5	30′ dark — 82.5
10′ dark — 27.0	
10′ $\Delta\mathfrak{J}$ — 23.0	30′ H + 11.0

$y_{O_2} = 11 \times 0.657 = 7.2$ cu. mm.

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathfrak{J} \times 30}{7.2} = \frac{82.5}{7.2} = 11.5$$

The duration of the experiment was about 8 hr. No notable decrease of the efficiency was observed.

In culture medium at pH 5 the quantum requirement was the same below and above the compensation point and was on the average 3.75.

In carbonate buffer at pH 9.2 the quantum requirement was the same below and at the compensation point, and 10.6 as average.

Thus, the quantum requirement for aliquots of the same cell suspension was nearly 3 times greater in carbonate buffer than in culture medium.

Experiment 3

June 6, 1949

Culture medium, pH 5. Gas phase 5% CO_2 in air. 290 cu. mm. cells in each vessel.

$\Delta J = 6.05$

No. 5	%	No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$
10′ dark — 25	10′ ΔJ — 14	10′ dark — 8.5	10′ ΔJ — 5.5
10′ dark — 22	10′ ΔJ — 13	10′ dark — 10.5	10′ ΔJ — 5.0
10′ dark — 21.5	10′ ΔJ — 11.5	10′ dark — 9.0	10′ ΔJ — 3.0
30′ dark — 68.5	30′ ΔJ — 38.5	30′ dark — 28.0	30′ ΔJ — 13.5
30′ H' + 30.0		30′ H + 14.5	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 43.4 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 42.2 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -0.97$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 30}{43.4} = 4\ 2$$

An aliquot of the same cell suspension was placed in a rectangular vessel with 2 side-arms, to which were added 0.2 ml. of 1 normal NaOH and filter paper.

Culture medium pH 5, gas space, air.

$v = 18.477$; $v_F = 7.40$; $k_{O_2} = 1.062$.

290 cu. mm. of cells.

60′dark — 183 60′ ΔJ — 163

60′ H + 20 mm.

$$y_{O_2} = 20 \times 1.06 = 21 \text{ cu. mm.}$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 60}{21} = \frac{6.05 \times 60}{21} = 17.3$$

This was one of our first experiments to indicate that light does not act on respiration at intensities otherwise yielding high efficiencies with adequate CO_2 pressure. Later experiments showed that with better CO_2 removal by alkali still less light action was obtained when the filter paper was replaced with glass beads.

Experiment 4

June 10, 1949

Culture medium, pH 5. Gas phase 5% CO_2 in air. 300 cu. mm. of cells in each vessel.

$\Delta J = 5.3$

No. 3		No. 5	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	k'_{CO_2} 1.253	$k_{O_2} = 1.046$	k_{CO_2} 1.634
10′ dark — 19.5	10′ ΔJ — 11.5	10′ dark — 9.0	10′ ΔJ — 5.5
20′ dark — 45.0	20′ ΔJ — 26.0	20′ dark — 17.0	20′ ΔJ — 10.5
30′ dark — 59.0	30′ ΔJ — 32.5	30′ dark — 22.5	30′ ΔJ — 13.0
60′ dark — 123.5	60′ ΔJ — 69.0	60′ dark — 48.5	60′ ΔJ — 29.0
60′ H' + 54.5		60′ H + 19.5	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 114 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 140 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.23$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 60}{114} = \frac{318}{114} = 2.8$$

Besides the quantum requirement of 3, this experiment shows that the "timing" has no dominant influence on the quantum requirement. For the pressure changes in both vessels were for different time periods:

No. 5: $H' = (h'_J + \Delta J + h'_J)$	No. 3: $H = (h_J + \Delta J + h_J)$
10′ + 8 mm.	10′ + 3.5 mm.
20′ + 19 mm.	20′ + 6.5 mm.
30′ + 26.5 mm.	30′ + 9.5 mm.

The above values are perfectly within the limits of the possible errors.

Experiment 5

June 13, 1949

Culture medium, pH 5. Gas phase 5% CO_2 in air. 300 mm.^{3} of cells in each vessel.

$\Delta J = 5.3$

No. 5		No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$V_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$
10′ dark — 26.0	10′ ΔJ — 15.0	10′ dark — 10.5	10′ ΔJ — 7.0
10′ dark — 27.5	10′ ΔJ — 14.5	10′ dark — 10.5	10′ ΔJ — 7.5
10′ dark — 26.5	10′ ΔJ — 15.5	10′ dark — 11.5	10′ ΔJ — 6.5
10′ dark — 22.0	10′ ΔJ — 10.5*	10′ dark — 10.5	10′ ΔJ — 6.5
10′ dark — 21.0	10′ ΔJ — 15.5	10′ dark — 11.0	10′ ΔJ — 7.0
50′ dark — 123.0	50′ ΔJ — 71.0	50′ dark — 54.0	50′ ΔJ — 34.5
50′ H' + 52		50′ H + 19.5	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 104 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 130 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.25$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 50}{104} = 2.5$$

From the dark values in No. 5 and No. 3 the respiration was calculated:

50′ dark H' = — 123 mm. H = — 54 mm.

$$\left.\begin{array}{l} x_{O_2} = -\ 202 \text{ cu. mm.} \\ x_{CO_2} + 232 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.15$$

and x_{O_2} for 60′ — 242 cu. mm. or $\frac{242}{300} \cdot 100 = 81\%$ of the cell volume/hr.

This experiment is remarkable for the low average figure of 2.5 obtained in a very good experiment. The only deviating reading among 20 readings is the one marked by*.

Experiment 6

June 14, 1949

Culture medium, pH 5. Gas phase 5% CO_2 in air. 280 cu. mm. of cells in each vessel. Both vessels continuously illuminated with white light for 27 hr.

$$\Delta \mathcal{J} = 5.4$$

No. 5		No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$

I. Beginning of measurement

June 14, 1:30 p. m.

$10' \mathcal{J} - 0.5$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 8.0$	$10' \mathcal{J} + 2.0$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 4.5$
$10' \mathcal{J} - 0.5$	$30' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 22.5$	$10' \mathcal{J} + 0.5$	$30' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 14.0$
$10' \mathcal{J} + 1.5$	$30' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 26.0$	$10' \mathcal{J} + 1.0$	$30' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 14.5$
$10' \mathcal{J} \quad 0$		$10' \mathcal{J} + 1.5$	
		$10' \mathcal{J} + 1.0$	
$40' \mathcal{J} + 0.5$	$70 (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 56.5$	$50' \mathcal{J} + 6.0$	$70' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 33$
$70' \mathcal{J} + 0.9$		$70' \mathcal{J} + 8.4$	
$70' H' + 55.6$		$70' H + 24.6$	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 91 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 103 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.13$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 70}{91} = 4.2$$

II. Start of 2nd measurement

June 15, 9:40 a. m.

No. 5		No. 3	
$10' \mathcal{J} + 2.5$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 11$	$10' \mathcal{J} + 2.5$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 7.0$
$10' \mathcal{J} + 3.0$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 12$	$10' \mathcal{J} + 2.0$	$10' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 6.5$
$20' \mathcal{J} + 5.5$	$20' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 23$	$20' \mathcal{J} + 4.5$	$20' (\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J}) + 13.5$
$20' H' + 17.5$		$20' H + 9.0$	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} + 22.4 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} - 20.2 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -0.9$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 20}{22.4} = 4.8$$

III. Start of 3rd measurement

June 15, 4:50 p. m.

The cells were washed in fresh culture medium because in the old medium the efficiency of the light appeared to decrease.

No. 5		No. 3	
10′ dark — 17.5	10′ ΔJ — 10.0	10′ dark — 8.5	10′ ΔJ — 6.0
10′ dark — 16.0	10′ ΔJ — 8.5	10′ dark — 8.5	10′ ΔJ — 5.0
10′ dark — 16.5	10′ ΔJ — 7.5	10′ dark — 8.5	10′ ΔJ — 6.5
10′ dark — 15.5			10′ ΔJ — 5.5
40′ dark — 65.5	30′ ΔJ — 26.0	30′ dark — 25.5	40′ ΔJ — 23.0
30′ dark — 49.2			30′ ΔJ — 17.2
30′ H' + 23.2		30′ H + 8.3	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 48.5 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 62 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = 1.28$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 30}{48.5} = 3.4$$

The respiration at the beginning of the experiment was 82% of the cell volume O_2/hr., and at the end of the experiment 45% of the cell volume O_2/hr. The washing of the cells in fresh culture medium had no influence on the respiration.

The experiment shows that the efficiency of light remained nearly constant when the cells were continuously illuminated with white light for more than 20 hr.

Experiment 7

June 16, 1949

5% CO_2 in air. The cells were washed with KNO_3-free culture medium (pH 5) and the efficiency was measured in KNO_3-free culture medium. Later KNO_3 was added and the efficiency was again measured. 300 cu. mm. of cells in each vessel.

$\Delta J = 5.4$

No. 5		No. 3	
v = 13.913	v_F = 7.00	v = 17.993	v_F = 7.00
k'_{O_2} = 0.665	k'_{CO_2} = 1.253	k_{O_2} = 1.046	k_{CO_2} = 1.634
	without KNO_3		
10′ dark — 26	10′ ΔJ — 17	10′ dark — 12	10′ ΔJ — 7
10′ dark — 23	10′ ΔJ — 15	10′ dark — 10	10′ ΔJ — 7
10′ dark — 23	10′ ΔJ — 14	10′ dark — 11	10′ ΔJ — 7
10′ dark — 23	10′ ΔJ — 15	10′ dark — 11	10′ ΔJ — 7
40′ dark — 95	40′ ΔJ — 61	40′ dark — 44	40′ ΔJ — 28
40′ H' + 34		40′ H + 16	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 51.6 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 53.7 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -\ 1.04$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta J \times 40}{51.6} = 4.2$$

Then 17.5 mg. KNO_3 was added to each vessel, to give 2.5 g. KNO_3/l.

No. 5		No. 3	
10′ dark — 17	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 9	10′ dark — 8	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 5
10′ dark — 15	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 9	10′ dark — 7	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 5
10′ dark — 16.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 8.5	10′ dark — 7.5	10′ $\Delta\mathcal{J}$ — 5.5
30′ dark — 48.5	30′ $\Delta\mathcal{J}$ — 26.5	30′ dark — 22.5	30′ $\Delta\mathcal{J}$ — 15.5
30′ H' + 22		30′ H + 7.0	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 50 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 66.7 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -\ 1.33$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 30}{50} = 3.2$$

This experiment shows that there is no striking effect of KNO_3 in the medium on the photosynthetic efficiency. In very prolonged experiments, of course, removal of a necessary constituent from the culture medium must influence the efficiency.

Experiment 8

July 20, 1949, Woods Hole

5% CO_2 in air. Culture medium, pH 5.
430 cu. mm. of cells in each vessel.

$\Delta\mathcal{J} = 5.65$

No. 5		No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	$v_F = 7.00$
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	$k_{CO_2} = 1.634$

Compensated with white light from above.

10′ $\mathcal{J}$ + 29.5	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 40.5	10′ $\mathcal{J}$ + 19.5	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 26
10′ $\mathcal{J}$ + 26.0	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 39.0	10′ $\mathcal{J}$ + 20.0	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 24.5
20′ $\mathcal{J}$ + 55.5	20′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 79.5	20′ $\mathcal{J}$ + 39.5	20′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 50.5
20′ H' + 24		20′ H + 11	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 37.2 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -\ 41.2 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -\ 1.10$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 20}{37.2} = 3.0$$

Continued, but compensated mainly from below with light from an incandescent lamp filtered through a red glass which transmitted wavelengths longer than 560 mμ.

No. 5		No.3	
5′ $\mathcal{J}$ + 18	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 22.5	10′ $\mathcal{J}$ + 19	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 24
5′ $\mathcal{J}$ + 16.5	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 25.0	10′ $\mathcal{J}$ + 16	10′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 22
5′ $\mathcal{J}$ + 16.0	5′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 20.0		
15′ $\mathcal{J}$ + 50.5	15′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 67.5	20′ $\mathcal{J}$ + 35	20′ ($\mathcal{J}$ + $\Delta\mathcal{J}$) + 46
20′ H' + 22.7		20′ $\mathcal{J}$ + 11	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +\ 32.3 \text{ cu. mm.} \\ y_{OC_2} = -\ 33.0 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -\ 1.02$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 20}{32.3} = 3.5$$

Finally all light was turned off:

No. 5	No. 3
10′ dark — 11	10′ dark — 6

$$10' \; x_{O_2} = -12.4 \text{ cu. mm.}$$
$$60' \; x_{O_2} = -74 \text{ cu. mm.},$$

that is, $\frac{74}{420} \times 100 = 18\%$ of the cell volume/hr.

At $(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J})$ in vessel 5, + 45 mm. were produced in 10′. The light action was therefore 45 + 12 = 57 mm. in 10′. Assuming a value of $\gamma = 1.0$, this means $y_{O_2} = 57 \times 1.42 \cdot 6 = 485$ cu. mm. O_2/hr., or 485/74 = 6.5 times respiration.

This experiment shows that 1) the efficiency of the added red light was essentially the same whether the respiration was overcompensated from above or from below, with white light or with red-yellow light; 2) a quantum requirement of 3.5 was obtained when respiration was 6.5 times compensated with a red-yellow light and a value of 3.0 when respiration was similarly overcompensated with white light.

Experiment 9

August 5, 1949, Woo ds Hole

Culture medium, pH 5. In vessels 5 and 3, gas phase 5% CO_2 in air. In vessel 34 air, in the two sidearms NaOH. In each aessel 230 cu. mm. of cells, suspended in 7 ml. culture medium.

$$\Delta\mathcal{J} = 5.7$$

No. 5		No. 3	
$v = 13.913$	$v_F = 7.00$	$v = 17.993$	v_F 7.00
$k'_{O_2} = 0.665$	$k'_{CO_2} = 1.253$	$k_{O_2} = 1.046$	k_{CO_2} 1.634

Respiration not compensated

20′ dark — 27.5	20′ $\Delta\mathcal{J}$ — 7	20′ dark — 13	20′ $\Delta\mathcal{J}$ — 2
20′ H' + 20.5 mm.		H + 11 mm.	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +23.6 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -19.3 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -0.82$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 20}{23.6} = 4.8$$

Respiration overcompensated

No. 5		No. 3	
20′ $\mathcal{J}$ + 57.5	20′ $(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J})$ + 76	20′ $\mathcal{J}$ + 39	20′ $(\mathcal{J} + \Delta\mathcal{J})$ + 48
20′ H' + 18.5		20′ H + 9	

$$\left.\begin{array}{l} y_{O_2} = +26 \text{ cu. mm.} \\ y_{CO_2} = -26 \text{ cu. mm.} \end{array}\right\} \gamma = -1.0$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times 20}{26} = 4.4$$

No. 34

$v = 18.87$ $v_F = 7.40$ $k_{O_2} = 1.09$

$$\left.\begin{array}{l} 10' \text{ dark} - 22 \\ 10' \ \Delta\mathcal{J} - 21 \\ 10' \text{ dark} - 18 \\ 10' \ \Delta\mathcal{J} - 18 \end{array}\right\} \text{no light action}$$

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\Delta\mathcal{J} \times t}{y_{O_2}} = > 100$$

But when a 100-w. incandescent lamp was turned on at a distance of 12 in. from vessel 34, the respiration was compensated by the white light.

This experiment shows, that at adequately low CO_2 pressure there was no light action by $\Delta\mathcal{J}$.

Acknowledgments

We wish to acknowledge with deep appreciation the facilities and laboratory accommodations for research and class demonstrations provided during the later phases of this work by Professor E. S. Guzman-Barron and by Dr. Charles Packard, Director, Marine Biological Laboratory, Woods Hole.We wish to thank Dr. Ernest Kun and Messrs. Jack Durell, Richard Klein, Burlyn Michel, and Martin Schwartz of the Physiology Class of this Laboratory for valued aid. Mrs. Lois B. Macri, Mrs. Clara F. Smith, and C. R. Newhouser, of the National Cancer Institute, provided extensive technical assistance.

Summary and Conclusions

Experiment No. 2 shows that the quantum requirement in carbonate buffer at pH 9 was 2-3 times the quantum requirement in acid culture medium saturated with 5% CO_2 in air (pH 5). This result was obtained for aliquots of the same cell suspension. It invalidates many efficiency experiments of the past, where for 10 years the conventional medium for quantum requirement determinations has been carbonate buffer, and the view has been widely adhered to that the minimum quantum requirement could be realized in carbonate buffer. But in no experiment in carbonate buffer at pH 9 have we observed lower quantum values than 8, the average being about 10.

Experiment No. 9 shows that in acid culture medium the quantum requirement is different according as the medium is saturated with 5% CO_2 or freed as nearly as possible of CO_2. When the culture medium was largely freed of CO_2, no O_2 was produced by a light intensity that in the presence of 5% CO_2 was highly efficient.

In all experiments carried out by the prescribed procedure in acid culture medium at pH 5, and saturated with 5% CO_2 in air, low quantum requirements were observed.The results of Expts. Nos. 1 to 9 are summarized in the following table in sequence. The asterisks mean that the respiration was overcompensated. In the doubly asterisked experiments the respiration was more than 6-fold compensated.

It may be seen from Table I that in acid culture medium saturated with 5% CO_2 in air the quantum requirements per molecule of O_2 produced were between 2.5 and 4.8, on the average near to 4. The reality of 3 in several instances cannot be excluded. Four-quanta in the red at 660 mμ mean 65% efficiency and 3-quanta would mean 87% efficiency in the transformation of light to chemical energy.

The observed assimilatory quotients, $\gamma = CO_2$ absorbed/O_2 produced, ranged between —0.8 and —1.33, with an average of —1.06. The deviation from —1.0 was in the opposite direction from that claimed by investigators who have reported outbursts of CO_2 in light[4,5]. On the contrary, on the average a little more CO_2 was absorbed in light than O_2 was produced. Thus, one of the two main loopholes that have been used to evade the high efficiency in photosynthesis is now closed. The other important loophoole—the participation of respiration in efficient photosynthesis in whatsoever a manner[14]—is now closed too, since the same high efficiencies have been obtained at more than 6-fold compensated respiration as at uncompensated respiration, where light has also been shown directly to be without notable influence.*

The fact must thus be envisaged that in a perfect nature photosynthesis is perfect too.

$\frac{1}{\Phi}$ $\left(\frac{h\nu}{O_2}\right)$	γ $\left(\frac{CO_2}{O_2}\right)$
4.6	—0.80
2.9*	—1.03*
4.5*	—0.90*
3.9*	—1.04*
3.6	—1.18
4.2	—0.97
2.8	—1.23
2.5	—1.25
4.2*	—1.13
4.8*	—0.90*
3.4	—1.28
4.2	—1.04
3.2	—1.33
3.0**	—1.10**
3.5**	—1.02**
4.8	—0.82
4.4	—1.00*
Average 3.7	—1.06

Table 1

References

1 Warburg, Otto, Reprinted in Katalytische Wirkungen der lebendigen Substanz. Julius Springer, Berlin, 1928.
2 Warburg, Emil, Photochemie. Handbuch der Experimentalphysik Vol. 18, p. 619. Leipzig, 1928.
3 Manning, W. M., Stauffer, J. F., Duggar, B. M., and Daniels, F., J. Am. Chem. Soc. 60 (1938), 266.
4 Emerson, R., and Lewis, C. M., Am. J. Botany 26 (1939), 808.
5 Ibid. 28 (1941), 789.
6 Warburg, Otto (trans.) Am. J. Botany 35 (1948), 194 (cf. Ref. 10, Chap. XXI).
7 Stoffwechsel der Tumoren. Julius Springer, Berlin, 1926.
8 Franck, J., and Loomis, W. E., Photosynthesis in Plants. The Iowa State College Press, Ames, Iowa 1949.
9 Spoehr, H. A., and Milner, H. A., Plant Physiol. 24 (1949), 120.
10 Warburg, O., Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, Werner Saenger, Berlin, 1948. Translation. Clarendon Press, Oxford, 1949.
11 Burk, D., and Lineweaver, H., Nature 135 (1935), 621.
12 Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 3 (1935), 165.
13 Warburg, O., and Schocken, V., Arch. Biochem. 21 (1949), 363.
14 Franck, J., Arch. Biochem. 23 (1949), 297.
15 Noddack, W., Z. physik. Chem. 185A (1939), 241.
16 Noddack, W., and Eichhoff, H., Z. physik. Chem. 185A (1939), 222.
17 Eichhoff, H., Biochem. Z. 303 (1939), 112.
18 Noddack, W., and Kopp, C., Z. physik. Chem. 187A (1940), 79.
19 Kopp, C., Biochem. Z. 310 (1941), 191.
20 Burk, D., Hendricks, S., Korzenovsky, M., Schokken, V., and Warburg, O., Science 110 (1949), 225.
21 Warburg, O., Burk, D., Schocken, V., Korzenovsky, M., and Hendricks, S., Arch. Biochem. 23 (1949), 330.
22 Warburg, O., Burk, D., Schocken, V., and Hendricks, S., Biochimica et Biophysica Acta, Meyerhof Festschrift Volume 4, pp. 335—346 (1950).

* *Zusatz 1961.* Ein ganz anderer Zusammenhang zwischen Lichtwirkung und Atmung ist 1950 entdeckt worden (vergl. Arbeit 11 dieses Buchs).

9 Extensions of photosynthetic experimentation*

by Otto Warburg, Dean Burk and Arthur L. Schade
Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

Chlorella pyrenoidosa was cultivated as previously described (Warburg & Burk, 1950) in acid culture medium prepared with water taken from a deep well. The culture bottles filled with 200 c.c. medium were inoculated with 100 cmm. cells and placed at a distance of 25 cm. from a 200 watt incandescent lamp in a water bath at 25°C. and aerated with 5% carbon dioxide in air. After 24 hr., when the cells had multiplied 4-fold, they were used for the experiments. No settling of cells occurred during the culturing.

I. Centrifuging

The cells were centrifuged in thin layers in broad cups for so short a time that by gentle shaking they could be resuspended in a few seconds. The use of strong, angle centrifuging, such as we had at our disposal at Urbana two years ago, is to be avoided. Heavily centrifuged cells are damaged, and partly destroyed by the process of resuspending, especially when mechanical agents are employed.

II. Use of Ammonia

The photosynthetic efficiency of the cells after harvest was determined in culture medium, the nitrate of which was replaced by ammonia at 1/10 the concentration of the nitrate (0.15 g. NH_4Cl/l.). In such solutions the assimilatory quotient of the young cultures employed was always near 1 (cf. Myers, 1949). In experiments of long duration the pH was not shifted to the alkaline side as could happen with nitrate as a source of nitrogen, so that there was no danger of carbon dioxide retention being developed. When the pH at the beginning of the experiment was 4.8, it was about 3.5 after 7 hr. of illumination. No influence of this acidification on the efficiency was observed. It was a further advantage of using ammonia that possible discussions as to whether the oxygen of the nitrate might have to be considered in the computation of the energy transformation were eliminated.

III. Optical Arrangement

The light source was a 200 watt high-pressure mercury lamp (Osram). A condenser of the aperture 1:1 provided a parallel light beam from which the green line 546

* Aus Symposia of the society for experimental biology Number V, Carbon Dioxide Fixation and Photosynthesis. 1951.

Zusatz 1961. Der methodische Fortschritt dieser Arbeit ist im wesentlichen die Ausnutzung der chemischen Aktinometrie zur Messung der Lichtabsorption in dem „trüben Medium“ der Zellsuspensionen, sowie die Teilung des Lichtstrahls mit 4 total reflektierenden Prismen.

mμ was isolated by the following filters; 5 cm. water, 2 cm. 5% $CuSO_4 . 10H_2O$, 1 cm. tartrazin (20 mg./100 c.c. H_2O), and 1 cm. Didym-plate (Schott-Jena).

The intensity of this green light beam was about 15 μmol. quanta (330 mm.^{3}) per min., or one hundred times that first employed by us at Urbana and twenty-five to fifty times that used in Bethesda. The green light beam was split by four totally reflecting prisms into two beams of equal intensities. These were measured by a bolometer (Lummer-Kurlbaum) of 9 cm^2. area, standardized against an American National Bureau of Standards lamp obtained through the courtesy of Dr CURTIS J. HUMPHREYS, Chief of the Radiometry Section. The manometric actinometer was standardized against the bolometer.

IV. The Two-Vessel Method

The divided light beam effected an improvement in the employment of the two-vessel method since the two vessels could be illuminated and darkened simultaneously. The two vessels, each with its equal-sized thermobarometer, were fastened on two opposite sides of the thermostat. The two branches of the divided light beam entered the thermostat in horizontal directions and were reflected by two 45^0 mirrors into the two vessels.

A second improvement that made efficiency determinations possible at high light intensities was the employment of increased motion of the cell suspension in vessels of increased volume. In our very earliest experiments it was sometimes observed that in the smaller of the two vessels then employed ($v = 13$ c.c., $v_F = 7$) the motion of the liquid was inhibited by striking the upper wall, whereas in the larger vessel ($v = 20$ c.c., $v_F = 7$) the liquid could swing freely, the consequence being that the motion of the cell suspensions in the two vessels was clearly different, and stronger in the greater vessel. We have now used as the smaller vessel the volumes $v = 20$ c.c. and $v_F = 7$, and as the larger vessel the volumes $v = 30$ c.c. and $v_F = 7$. The bottom area of both these vessels was again about 7.5 cm.^{2}. The vessels were shaken by horizontal motion at the increased rate of 220 per min., and when the helmets (male parts) of the attaching manometers were hollow, no splashing in the manometer capillaries occurred no matter how rapid the shaking. No foaming occurred even in experiments of 7 hr. duration.

In these two vessels of 20 and 30 c.c. volume, the 7 c.c. of cell suspension could swing freely and showed during the motion of the vessels the same geometrical outline, that is, a downwardly concave surface with a height lowest in the middle that was not less than one-half the height at the ends of the vessels.

These remarks will emphasize that the two-vessel method applied to biophotochemistry needs special considerations not demanded by routine manometry, especially when high light intensities and light actions are involved. Not only is equal physical equilibration in the two vessels demanded, but also equal intermittency of illumination. The unusual γ (CO_2/O_2) values of photosynthesis reported in the literature* are in our opinion caused in part by inadequate motion of the smaller vessel. In fact, such γ values can often be normalized by increasing the shaking rate.

* *Zusatz 1961.* By R. EMERSON.

V. Adjustment of the Compensating Light

By the principle of the light increment (WARBURG & BURK, 1950) the technical and theoretical difficulties caused by respiration may be overcome. Respiration is overcompensated by unmeasured white light and photosynthetic yield measured only for an *increment of measured light*. When this increment is small in comparison with the compensating light, the general conditions of the cells are virtually not altered by the addition of the increment, as is required when photosynthesis is computed by our equations.

Since it was found in our earlier experiments (WARBURG & BURK, 1950) that a given light increment, added to dark or compensated or considerably overcompensated cells, proved to be equally efficient, it is unnecessary to adjust the compensating light in such a way that in both vessels exactly the same amount of compensating light is absorbed. But if such an exact adjustment is desired, the following method has been found to be useful. Cells are suspended in carbonate mixture and equal volumes placed into the two vessels used for the two-vessel method. A 100-watt incandescent lamp is placed above the thermostat and shifted until photosynthesis is found to be equal in the two vessels. Because of the scattering of the light by the cells, this method is to be preferred to an adjustment by means of two corresponding chemical actinometers.

VI. Long Experiments

It has been confirmed that the efficiency of photosynthesis remains constant for longer periods of time when respiration is overcompensated by diffuse white light in such a manner that all cells are constantly illuminated. Such a result may be expected, since the conditions are then those of the culturing; a chemical or physical explanation is lacking.

VII. Use of Carbonate Media

Although it is now widely considered that maximum efficiencies cannot be obtained in carbonate solutions, such solutions may be useful in many respects as an experimental tool. Equal parts of $M/10$ K_2CO_3 and $M/10$ $NaHCO_3$ may be mixed to yield a pH of about 10. The quantum requirement of our cells suspended in such a mixture was about 10.

A first application of carbonate solution has already been mentioned in Section IV. A second application may be made to check that the motion of both vessels in the two-vessel method is adequate. Equal amounts of cells, suspended in 7 c.c. carbonate mixture, are placed in each of the two vessels that are then shaken and illuminated as in the efficiency experiments in acid medium. When equal photosynthesis is obtained in both vessels then one has an indication that not only physical equilibration but also light intermittency are equal in the two vessels for the special conditions of vessels, amounts of liquid and cells, and light intensity, etc., employed.

A third application may be made to transmission experiments. Increasing amounts of cells, say from 25 to 300 mm.^{3}, are suspended in 7 c.c. carbonate mixture, and placed in turn into the same vessel and photosynthesis effected by a given beam of light determined. One thereby obtains a curve showing for each amount of cells the relative photosynthesis obtained up to the maximum that may be reached with $\lambda = 546$ mμ at 300 mm^3. cells where light absorption is virtually complete. Then photosynthesis at any given cell concentration, divided by the maximum photosynthesis, represents the fraction α of the absorbed light, or $(1 - \alpha)$ is the transmission. It is necessary in applying this method that the light intensity be so low at all cell concentrations that photosynthesis is proportional to light intensity.
Note. When cells suspended in carbonate mixtures are used as described for comparative actinometric purposes, it is important to know that in carbonate there is an induction period of minutes until the light action is fully developed manometrically. The cause of this induction is chemical; it cannot be merely physical equilibration, because for the same shaking rates and same conditions there is no corresponding induction if the cells are suspended in acid culture medium. With cells in carbonate, therefore, transition periods of at least 5 min. have to be considered, whereas with cells in acid culture medium this is not ordinarily necessary if the light intensity is not extreme.

VIII. Actinometric Determination of Transmission

Another method of determining light transmission through cell suspensions may be based on the chemical actinometer. A small vessel, such as used for the two-

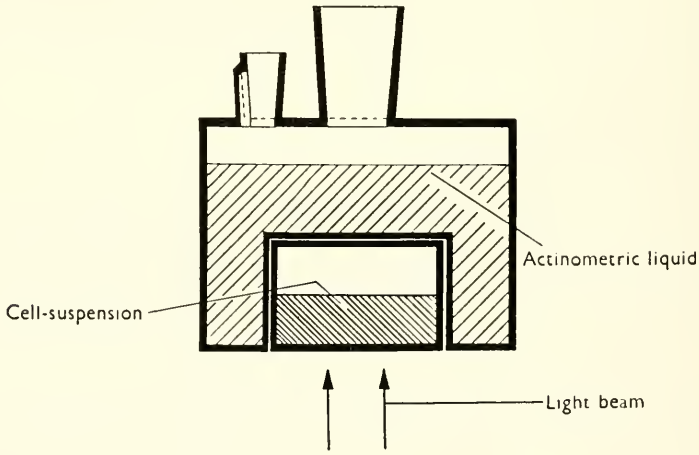


Fig. 1. Actinometric vessel for measuring light transmission of *Chlorella* cell suspension, contained in inner separable compartment, under conditions of manometric shaking.

vessel method, contains the cell suspension. It is surrounded by a larger vessel that contains the actinometric liquid and is connected with a manometer for measuring oxygen consumption. Both vessels are quartz vessels, blown by Lempert,

Berlin-Reinickendorf, (Fig. 1). The volume of the small vessel is about 20 c.c., that of the large vessel 120 c.c. 7 c.c. of cell suspension are inserted into the small vessel through a small stopperable aperture (not illustrated), and 80 c.c. of actinometric liquid are put into the big vessel. The small vessel is not connected to the large vessel but is held in place by rubber bands.

The combined two vessels are shaken at a rate of 200 turns per min. A collimated light beam enters through the bottom of the small vessel. The fraction of the light not absorbed leaves the vessel only negligibly (less than 1%) in the back direction, but goes mainly through the upper wall and secondarily the side walls into the actinometric chamber, where it is completely absorbed, producing oxygen consumption.

Two measurements have to be made, first while the small vessel contains water, and second when it contains the cell suspension. Let the first pressure change be $(\Delta p)_{\text{water}}$ and the second $(\Delta p)_{\text{cells}}$, then if

$$\Phi = O_2/h\nu = 1,$$

then the light transmission through the cell suspension is

$$\frac{(\Delta p)_{\text{cells}}}{(\Delta p)_{\text{water}}}.$$

There is the difficulty that $\Phi = 1$ only at low light intensities. At higher light intensities Φ declines. In consequence, the transmission has to be determined at light intensities of 1/15 μmol. quanta per min., as used in earlier calibration experiments (Warburg & Schocken, 1949). Experiments at higher light intensities, corrected by an intensity response curve, are not generally advisable, because of the difficulty of estimating the intensities at which the scattered light enters the actinometric vessel.

IX. Results

With the various extensions of technique described here we have continued to confirm our previously reported results (Warburg & Burk, 1950). With 300 mm.^{3} of cells per vessel where absorption of the green mercury line is essentially complete, a quantum requirement of 4, with fluctuations between 3 and 5, per molecule of carbon dioxide consumed or oxygen produced, has been observed. Again, *with low light intensities*, no influence of timing on yield was noted. The yield remained the same whether the light increment was added and removed every 5 (or 10 or 15) min., or if the sequence was 1 hr. with increment and 5 (or 10 or 15) min. without increment, and so forth. Again, the assimilatory quotient and the respiratory quotient were either equal or different. Equality of these two quotients is immaterial, and to ask that they should be equal is to misunderstand the equations of the two-vessel method.

With 50 mm.^{3} cells per vessel, that is, about 6.5 mm.^{3} cells per sq.cm. of bottom area, about 50% of the wavelength 546 mμ was transmitted by the cell suspension in motion. To obtain the same or greater light action pressure changes, as obtained with 300 mm.^{3} of cells, higher light intensities were applied, so high that photo-

synthesis often amounted to 30% of the value at light saturation. Under such conditions the observed quantum yields were consistent with the minimum requirement of 3 to 5 quanta at lower light intensities, and were a function of light increment intermittency[1] and intensity.

References

1 See Burk, D., and Warburg, O., Naturwissenschaften 37 (1950), 560, and Z. Naturforsch. (in the Press, 1951). Myers, J., Chap. 17 of Photosynthesis in Plants, by J. Franck and W. F. Loomis. Iowa: The Iowa State College Press (1949).

Warburg, O., and Burk, D., Arch. Biochem. 25 (1950), 410.

Warburg, O., and Schocken, V., Arch. Biochem. 21 (1949), 363.

10 1-Quanten-Mechanismus und Energie-Kreisprozeß bei der Photosynthese*

Von Dean Burk und Otto Warburg

Belichtet man Chlorella intermittierend und monochromatisch mit hohen Lichtintensitäten, indem man je eine Hellminute und eine Dunkelminute aufeinanderfolgen läßt, und mißt dabei die absorbierte Lichtenergie sowie den Gaswechsel der Algen, so finden wir nunmehr maximal eine „Quantenausbeute" von 1 in jeder Hellminute, d. h. 1 Mol absorbierter Lichtquanten bewirkt die Absorption von 1 Mol Kohlensäure und die Entwicklung von 0,8 bis 1 Mol Sauerstoff ($\gamma = CO_2/O_2 = -1$ bis $-1{,}25$). In jeder Dunkelminute finden wir den umgekehrten Prozeß, Entwicklung von Kohlensäure und Absorption von Sauerstoff, auch hier $\gamma = CO_2/O_2 = -1{,}0$ bis $-1{,}25$. Dieser Verbrennungsprozeß ist nahezu proportional der Lichtintensität in der Hellperiode und erreicht in unsern Versuchen bis zu dem 12fachen der gewöhnlichen Atmung (12faches Volumen der Zellen an Sauerstoffverbrauch je Stunde). Beide Prozesse, der durch das Licht angeregte Verbrennungsprozeß und der im Licht hinzukommende umgekehrte Prozeß, sind gegenseitig voneinander abhängig; sie sind durch einen Kreisprozeß miteinander verbunden.

Offenbar ist dieser Kreisprozeß die Lösung des Quantenproblems der Kohlensäureassimilation. Wenn etwa 120000 cal für die Reduktion eines Mols CO_2 notwendig sind, so liefert das Licht davon (im rot) 40000 cal und der Verbrennungsprozeß 80000 cal. Dabei wird im Licht ein *ganzes* Mol CO_2 je Mol absorbierter Quanten gewonnen, aber $^2/_3$ dieses Gewinns werden in der Verbrennungsphase des Kreisprozesses wieder verbraucht, so daß in der Bilanz der Gewinn nur $^1/_3$ Mol Kohlenstoff je Mol Quanten beträgt; d. h., daß 3 Mole Quanten absorbiert werden müssen, damit 1 Mol CO_2 durch den vollständigen Kreisprozeß reduziert wird.

Chemosynthese und Photosynthese wirken also bei der Assimilation der Kohlensäure in den grünen Pflanzenzellen zusammen. Die Chemosynthese liefert die dem Lichtquant fehlende Energie, erhält aber, nachdem das Lichtquant gewirkt hat, ihren aufgewendeten Brennstoff von der Photosynthese wieder zurück. So erreicht die Natur, daß die energiearmen Quanten des sichtbaren Sonnenlichts eine photochemische Reaktion bewirken können, die das 3fache der Energie eines Lichtquantums erfordert.

Die Versuchstechnik war eine weiterentwickelte 2-Gefäß-Methode: geteilter Lichtstrahl, hohe monochromatische Lichtintensität (z. B. 2 Mikromole Quanten je Minute in jedem der beiden Teile des Strahls), bolometrische Messung der Intensität, bezogen auf die Lichtstandardlampe des Bureau of Standards in Washington; wenig Zellen im Gefäß, Transmissionsmessung mit dem kürzlich beschriebenen Transmissions-Aktinometer[1]; und so schnelle Schüttelung der

---

* Aus Die Naturwissenschaften 37 (1950): 560

Gefäße, daß keine physikalisch bedingten Übergangserscheinungen beim Wechsel hell—dunkel auftraten.

Zur Untersuchung des Kreisprozesses ist der Wechsel hell—dunkel in 1-min-Perioden geeignet. Zur Messung *des Nutzeffektes* des Kreisprozesses ziehen wir den Wechsel von 2 Hell-Perioden verschiedener Lichtintensität vor, also die im vorigen Jahr eingeführte Methode des Lichtinkrements (z. B. 1-min-Wechsel von grün und grün der halben Intensität). Das Ergebnis war, unabhängig von der Wellenlänge, ein Quantenbedarf von 1 in der Photophase für blau (λ 436 mμ), grün (λ 546 mμ) und rot (λ 644 mμ).

Jedoch muß hervorgehoben werden, daß der Quantenbedarf für die Bilanz der Kohlensäureassimilation nunmehr, nach der Entdeckung des Kreisprozesses, nicht mehr ganzzahlig zu sein braucht. Etwa 2,5 Quanten je Molekel Sauerstoff ist die thermodynamisch zulässige Grenze. Etwa 3 ist die Zahl, die wir am häufigsten gefunden haben. Dies entspricht einer Ausnutzung der absorbierten Lichtenergie von über 80 % im rot.

Literatur

1 Warburg, Otto, Burk, Dean, and Schade, Arthur L., Extensions of Photosynthetic Experimentation, Symposium Volume V, Society for Experimental Biology, 1951 (covering Symposium on Carbon Dioxide Fixation, Sheffield, July, 1950).

11 Ein-Quanten-Reaktion und Kreisprozeß der Energie bei der Photosynthese*

Von Dean Burk** und Otto Warburg

Die Resultate dieser Arbeit[1] ergaben sich aus einer Weiterentwicklung der Methoden zur Messung der Photosynthese. Durch Verwendung von Quecksilber- und Cadmium-Hochdrucklampen konnte die Intensität des monochromatischen Lichts bis auf das 20-fache gesteigert werden. Der Strahl des monochromatischen Lichts wurde in zwei Strahlen gleicher Intensität geteilt, so daß nunmehr bei der Zwei-Gefäß-Methode die beiden Gefäße gleichzeitig belichtet werden konnten. Die Gesamtintensitäten der beiden Lichtstrahlen wurden mit einem Großflächen-Bolometer gemessen, das gegen eine Standard-Lampe des amerikanischen Bureau of Standards geeicht war. Eine Methode zur Messung der Lichtabsorption in dünnen, schnell schwingenden Zellsuspensionen wurde auf der Grundlage der manometrischen Aktinometrie entwickelt, so daß das Prinzip der vollständigen Lichtabsorption aufgegeben werden konnte, d. h., daß die Zell*mengen* und damit der Ballast der Atmung bis auf $^1/_{10}$ verkleinert werden konnten. Die schwingende Bewegung der Zellsuspensionen in den manometrischen Meßgefäßen wurde soweit beschleunigt, daß selbst bei Übergängen von den größten Lichtintensitäten zu Dunkel der Gasausgleich zureichend war und keine manometrischen Nachwirkungen auftraten.

Wurde mit dieser Technik die Photosynthese bei einem Wechsel von 1 Min. hell und 1 Min. dunkel gemessen, so wurde unter geeigneten Bedingungen in jeder Hellminute pro absorbiertes Lichtquant etwa 1 Mol. Kohlensäure absorbiert und etwa 1 Mol. Sauerstoff entwickelt. Der assimilatorische Quotient CO_2/O_2 war dabei — 1 bis —1,2. Die manometrischen Ausschläge waren trotz der kurzen Meßzeiten hinreichend groß. Rot (644 mμ), Grün (546 mμ) und Blau (436 mμ) gaben nahezu die gleichen Resultate. 15 mm³ Zellen und 200 mm³ Zellen pro Ge-

* Aus Zeitschrift für Naturforschg. 66 (1951): 12—22.

** Guest Research Worker of the Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, and United States Public Health Service Special Research Fellow (permanent address: National Cancer Institute, Bethesda, Maryland).

Zusatz 1961. Da es keine Mehrquantenreaktionen in der Photochemie gibt, so beginnt die Aufklärung des Mechanismus jeder photochemischen Reaktion mit der Entdeckung der Ein-Quanten-Reaktion. Deshalb wird diese Arbeit von 1951 immer an die Spitze aller Arbeiten zu stellen sein, deren Problem der chemische Mechanismus der Photosynthese ist. Alle Schlußfolgerungen der Arbeit von 1951 sind in den folgenden 10 Jahren mit unabhängigen Methoden bestätigt worden; und stillschweigend ist das „Quantenrätsel" aus der Literatur der Photosynthese verschwunden. 1 Lichtquantum entwickelt aus dem Photolyten der Photosynthese — einer Kohlensäureverbindung — 1 O_2, von dem $^2/_3$ zurückreagieren und dabei neuen Photolyten bilden. Besser als in dieser ersten Darstellung sind die Ergebnisse in einem Vortrag vor der Deutschen Bunsengesellschaft im Mai 1951 beschrieben worden, der als Beitrag 11 dieses Buchs abgedruckt ist.

fäß gaben die gleichen Resultate. Wurden aber die Zellen in der Meßlösung 10 Min. auf 55° erhitzt, so wurden keine Druckänderungen beim Wechsel Hell → Dunkel beobachtet. Wurden die Wechselzeiten zwischen Hell und Dunkel verlängert, so wurden die photochemischen Ausbeuten kleiner. Die Einschaltung von Dunkelminuten zwischen die Hellminuten war also notwendig, um bei den hohen Lichtintensitäten die hohen photochemischen Ausbeuten zu erhalten.

In der Tat hängt mit der Lichtreaktion eine Dunkelreaktion zusammen, die ein Verbrennungsprozeß ist, bei dem umgekehrt wie im Licht Sauerstoff verbraucht und Kohlensäure entwickelt wird. Es ist gleichgültig, ob man diese durch Licht induzierte Dunkelreaktion Atmung oder anders nennt. Die Dunkelreaktion verläuft um so schneller, je schneller — bei dem Wechsel von Hell und Dunkel — die Lichtreaktion verläuft, d. h., je höher die Lichtintensität ist. Die Dunkelreaktion verläuft um so langsamer, je größer die Wechselzeiten Hell → Dunkel sind, verhält sich also in dieser Hinsicht wie die Lichtreaktion.

Die Größe der geschilderten Effekte wird anschaulich, wenn wir den Gaswechsel auf die Stunde umrechnen und ihn mit dem Zellvolumen vergleichen. Für *Chlorella* fanden wir früher bei Sättigung mit Licht und 20° eine Sauerstoffentwicklung von etwa 2000% des Zellvolumens pro Stunde und im Dunkeln eine Sauerstoffaufnahme von etwa 100% pro Stunde. Auch hier finden wir im Licht Sauerstoff-Entwicklungen von 2000% pro Stunde, aber nicht als Sättigungswert, sondern mit hohen photochemischen Ausbeuten; und wir finden im Dunkeln Sauerstoffaufnahmen bis zu 1000% pro Stunde.

Diese schnellen Licht- und Dunkelreaktionen sind zeitlich und ursächlich miteinander verbunden und hängen quantitativ voneinander ab. Nach der Definition geht die Lichtreaktion nur im Licht vor sich. Von der Dunkelreaktion jedoch muß angenommen werden, daß sie auch im Licht vor sich geht. Dann hat die Dunkelreaktion, bei Gleichheit von Hell- und Dunkelperioden, die doppelte Zeit wie die Lichtreaktion zur Verfügung und scheint deshalb oft die halbe Geschwindigkeit der Lichtreaktion zu haben.

In der Koppelung zwischen Licht- und Dunkelreaktion sehen wir die Lösung des Quantenproblems der Photosynthese. Die Lichtreaktion, in der Sauerstoff abgegeben und Kohlensäure fixiert wird, ist eine Ein-Quanten-Reaktion wie alle photochemischen Reaktionen der unbelebten Welt. Aber damit diese Ein-Quanten-Reaktion möglich wird, hat die lebende Natur die Lichtreaktion mit einer energieliefernden Dunkelreaktion gekoppelt, die von den notwendigen etwa 110000 cal. 70000 cal. zu liefern hat, während das Licht nur die fehlenden 40000 cal. hinzufügt. Es ist eine Besonderheit dieses eminent biologischen Mechanismus, daß dieselbe Substanz, die im Licht gewonnen wird, ihrerseits der Brennstoff der Dunkelreaktion ist. So verzehrt die Dunkelreaktion in einem Kreisprozeß immer wieder den größeren Teil des Lichtgewinns, und der bleibende Substanzgewinn ist nicht der Substanzgewinn in der Lichtreaktion, sondern die Differenz zwischen Lichtgewinn und Dunkelverbrauch.

Wie groß ist dieser bleibende Gewinn? Aus thermodynamischen Gründen kann er höchstens etwa $^1/_3$ des Lichtgewinns sein, da die Energie eines Mols Lichtquanten im Rot 40000 cal., also nur etwa $^1/_3$ des Energiebedarfs der Photosynthese

beträgt; während nach der unteren Seite keine Grenzen gesetzt sind und die Dunkelreaktion *alle* Substanz verbrauchen kann, die im Licht gewonnen worden ist. Wir fanden unter optimalen Bedingungen einen bleibenden Gewinn von $^1/_3$ bis $^1/_5$ der im Licht gewonnenen Substanz, d. h., daß 3 bis 5 Quanten absorbiert werden mußten, damit 1 Molekül Sauerstoff in der Bilanz des Kreislaufes entwickelt oder 1 Molekül Kohlensäure aufgenommen wurde. So haben wir den Anschluß an unsere früheren Versuche erreicht, in denen wir bei niedrigen Lichtintensitäten und kontinuierlicher Belichtung einen Quantenbedarf von im Mittel 4 für die Entwicklung von 1 Molekül Sauerstoff gefunden hatten. Offenbar sind die meisten unserer früheren Messungen, da es nur *einen* Mechanismus der Photosynthese gibt, Bestimmungen der *Bilanz* des Kreisprozesses gewesen.

Hrn. Curtis J. Humphreys, Chief, Radiometry Section, des Amerikanischen Bureau of Standards danken wir für 2 Standardlampen zur Eichung unsres Bolometers.

Für die Hilfe bei unsrer Arbeit sprechen wir Hrn. Walter Schröder und Hrn. Horst Geleick unsern Dank aus.

1. Züchtung der Zellen

Chlorella pyrenoidosa wurde, wie früher[2], in Gaswaschflaschen gezüchtet, die mit 5% CO_2 in Luft so schnell durchströmt wurden, daß keine Sedimentierung eintrat. Die Flaschen standen bis zu $^1/_3$ ihrer Höhe in Wasser von 25° und 20 cm von einer 200-Watt-Metallfadenlampe entfernt. Der Raum war nicht verdunkelt, so daß die Zellen auch Tageslicht erhielten. Die Einsaat betrug 50 mm³.

Die Kulturlösung wurde bereitet durch Lösen von 10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl und 5 g KNO_3 in 2 *l* Brunnenwasser, das einem im Institutsgarten befindlichen Abessinierbrunnen (18 m tief) entnommen wurde. Zusatz von 2,8 ccm *n*-H_2SO_4 brachte p_H auf 4,5. 12 mg $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ wurden nach dem Ansäuern zugesetzt.

Hatten sich die Zellen nach 2×24 Stunden von 50 auf 800 mm³ vermehrt, so wurden sie in breiten Zentrifugiergläsern aus so niederer Schicht abzentrifugiert, daß etwa 1 Minute Zentrifugieren genügte. Scharfes Zentrifugieren, besonders in Winkelzentrifugen, ist zu vermeiden. Die abzentrifugierten Zellen müssen sich beim Aufgießen neuer Lösung sofort wieder verteilen.

Bei der Messung (nicht bei der Kultur) wurde, einer Anregung von Jack Myers[3] folgend, Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle benutzt. In obiger Kulturlösung wurden die 5 g KNO_3 durch 0,3 g NH_4Cl ersetzt. Mit dieser „Meßlösung" wurden die Zellen einmal auf der Zentrifuge gewaschen. Dann wurden sie in neuer Meßlösung resuspendiert. p_H in den Meßgefäßen war dann 4,5 und sank in langen Versuchen bis auf 3,5, ohne daß die Ausbeute schlechter wurde. Die Gefahr der Ausbildung einer CO_2-Retention, wie in langen Versuchen bei Benutzung von KNO_3 als Stickstoffquelle, war also hier vermieden.

2. Manometrie

Bei allen Versuchen wurde die 2-Gefäß-Methode benutzt, deren Gleichungen für die besonderen Zwecke der Photosynthese-Messungen in einer vorhergehenden Arbeit zusammengestellt sind[2]. Das Flüssigkeitsvolumen in den beiden Gefäßen war immer gleich und betrug 7 cm³. Die Grundfläche der Kästchen war etwa

8 cm^2, die Gesamtvolumina waren verschieden und betrugen z. B. für *ein* Paar 31 und 21, für ein *anderes* Paar 21 und 16 cm^3. Jedes Gefäßpaar war an den Manometern so montiert, daß sich die *Böden* der Gefäße im Thermostaten auf gleichem Horizontal-Niveau befanden. Wenn es die Größe der Ausschläge erlaubte, zogen wir das erste Paar dem zweiten vor. Der Durchmesser der Manometer-Kapillaren betrug 1,2 mm. Die Helme der Kapillaren waren hohl geschliffen. In den Gasraum wurde Luft mit etwa 10 Vol.-% CO_2 eingefüllt.

Die Bewegung der Gefäße war horizontal mit einer Exkursion von 1,7 cm und einer Frequenz von 200 pro Minute. Hierbei wurde die Flüssigkeit in den Gefäßen in eine schwingende Bewegung versetzt und der Gasaustausch zwischen Flüssigkeit und Gasraum so beschleunigt, daß selbst bei Wechselzeiten von nur 1 Minute zwischen Hell und Dunkel, und trotz sehr hoher Lichtintensitäten, physikalische Nachwirkungen nicht beobachtet wurden. Keine Flüssigkeit spritzte dabei, wenn die Gefäße richtig montiert waren, in die Kapillaren. Keine Schaumblasen bildeten sich selbst in 7stündigen Versuchen.

Man achte darauf, daß die Gefäßböden klar und farblos sind. Quarzgefäße sind am sichersten. Für jedes Gefäßpaar und für jeden benutzten Spektralbezirk überzeuge man sich mit Hilfe des Bolometers, daß die Licht-Transmission der Gefäßböden gleich ist.

Der Thermostat hatte die Maße 76 × 20 × 18 cm. Eine der beiden kurzen Wände war durch eine Glasscheibe ersetzt, durch die die Lichtbündel eintraten. Die beiden Gefäße des Paares wurden einander gegenüber auf den Längsseiten des Thermostaten eingehängt, jedes Versuchsgefäß mit einem Thermobarometergefäß gleicher Abmessungen. Zwei Beobachter waren notwendig, da die Druckänderungen auf den beiden Seiten des Thermostaten gleichzeitig abgelesen werden mußten.

3. Teilung des Lichtstrahls

Während bei unsern bisherigen Anwendungen der 2-Gefäß-Methode nur *ein* Lichtstrahl benutzt wurde, der zwischen den beiden Gefäßen des Paares hin- und

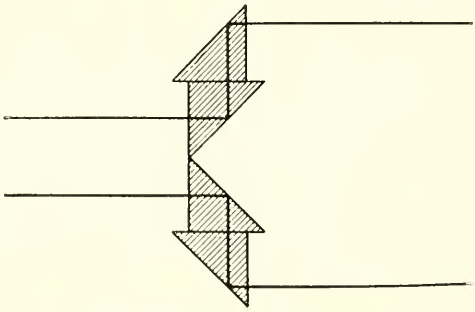


Abb. 1. Teilung des Lichtstrahls

hergeschoben wurde, haben wir nunmehr unseren Lichtstrahl geteilt, so daß beide Gefäße des Paares gleichzeitig belichtet werden konnten. Auf Vorschlag von Herrn Dr. Ritter der Firma *Halle*, Berlin-Steglitz, bewirkten wir diese Teilung

durch 4 total reflektierende bewegliche Prismen in der skizzierten Anordnung (Abb. 1), bei der die Verteilung des Lichts auf die beiden Strahlen mit Hilfe der inneren Prismen und der Abstand der beiden Strahlen mit Hilfe der äußeren Prismen reguliert werden konnte. Wir justierten die Intensität der beiden Strahlen mit Hilfe des Bolometers.

War die Intensität der beiden Strahlen *außerhalb* des Thermostaten gleich, so wurde sie *innerhalb* des Thermostaten, am Ort der Versuchsgefäße, mit dem Actinometer geprüft, indem die Versuchsgefäße durch Actinometergefäße gleicher Abmessungen ersetzt wurden. So überzeugten wir uns, daß gleichviel Licht in die beiden Versuchsgefäße eingestrahlt wurde.

Wir überzeugten uns weiterhin, daß in den beiden bewegten Gefäßen des Paares bei gleicher Einstrahlung auch gleichviel Licht absorbiert wurde — was nicht selbstverständlich war. Anstatt Zellen, suspendiert in saurer Lösung, gaben wir Zellen, suspendiert in Carbonatlösung (p_H 9,5), in die beiden Gefäße des Paares und erhielten für gleiche Zellmengen gleiche Lichtwirkungen.

4. Strahlengang

Strahlungsquellen waren Quecksilber-Hochdrucklampen von 200 Watt und Cadmium-Hochdrucklampen von 500 Watt Stromverbrauch, beide von der *Osram-Studiengesellschaft* in Berlin. Ein Kondensor von 7 cm Brennweite und 5 cm Durchmesser erzeugte ein paralleles Lichtbündel, dessen Querschnitt durch eine hinter dem Kondensor angebrachte Irisblende variiert werden konnte. Es folgten 5 cm Wasser, Filter für Wärme- und sichtbare Strahlen, dann das Prismensystem zur Teilung des Strahls und weiterhin auf dem Weg eines jeden der beiden Strahlen eine Linse von 17 cm Brennweite und 5,5 cm Durchmesser. Die nunmehr konvergierenden Strahlen traten in horizontaler Richtung in den Thermostaten ein, wo sie durch zwei 45^0-Silberspiegel vertikal nach oben in die beiden Meßgefäße reflektiert wurden.

Die beiden Linsen wurden dabei so eingestellt, daß sie auf den Böden der Meßgefäße ein Halb-Bild der Irisblende erzeugten, das so klein war, daß es bei der Bewegung der Meßgefäße innerhalb der Grundflächen blieb.

5. Wellenlängen

Die Wärmestrahlen wurden in jedem Fall durch 5 cm Wasser und 2 cm 10proz. $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ entfernt.

Es folgten Farbgläser von Schott (Jena) oder im Rot Interferenzscheiben. Im besonderen dienten zur Isolierung von

644 mμ aus Cd-Lampe	Interferenzscheibe.
578 mμ aus Hg-Lampe	2 mm O.G. Nr. 3.
546 mμ aus Hg-Lampe	2 mm O.G. Nr. 4 und 10 mm Didymglas.
436 mμ aus Hg-Lampe	2 mm B.G. Nr. 12 und 2 mm G.G. Nr. 13
366 mμ aus Hg-Lampe	2 mm U.G. Nr. 1.

Es war leicht, auf diese Weise Intensitäten zu gewinnen, die für jeden der beiden Strahlen 2 bis 3 Mikromole Quanten pro Minute betrugen. Wenn man die Wahl

zwischen Filtergläsern und Interferenzscheiben hat, sind Filtergläser vorzuziehen, weil sie größere Intensitäten liefern. Nur im Rot ist man auf die Interferenzscheiben angewiesen.

Zur Prüfung, ob den benutzten Spektralbezirken Ultrarot oder Rot langwelliger als 670 beigemengt war, wurde hinter die Filter oder Interferenzscheiben ein 1-cm-Trog gebracht, der eine Lösung von 3 mg Äthylchlorophyllid in 5 ccm Pyridin enthielt. Dieser Trog mußte die bolometrische Wirkung der Lichtstrahlen bis auf einen zu vernachlässigenden Bruchteil zum Verschwinden bringen.

6. Bolometer

Zur Messung der Lichtintensitäten diente ein Flächenbolometer nach KURLBAUM, das von der Firma *Christian Lassen*, Berlin hergestellt war. Die Fläche eines der 4 mit Platinstreifen bespannten Rahmen betrug 10 cm^2, die „nutzbare Fläche", die durch Blenden festgestellt wurde, betrug 5 cm^2. Die Rahmen waren in einem Schutzkasten aus Kupfer, Hartgummi und Holz montiert und durch eine 2 mm starke herausnehmbare Lithiumfluoridscheibe gegen Luftströmungen geschützt. Die bei der Bestrahlung in der Brücke entstehende Potentialdifferenz wurde potentiometrisch gemessen, wobei ein Zernicke-Galvanometer als Null-Instrument diente.

Zur Eichung des Bolometers dienten zwei Kohlefadenlampen des Amerikanischen Bureau of Standards, C 506 und C 507. In 2 m Entfernung strahlten diese Lampen $62{,}5 \times 10^{-6}$ Watt pro cm^2, bei einer Betriebs-Stromstärke von 0,350 Ampere. Die Durchlässigkeit der Fluoridscheibe für die Standardstrahlung betrug 92%. Der Potentiometerausschlag bei der Eichung betrug etwa 36 Mikrovolt, wenn der Bolometerstrom 60 Milliamdere betrug, und die Bolometerblende in 2 m Entfernung vom Standard eine Fläche von 3,974 cm^2 hatte.

Die bei den Versuchen angewendeten Lichtintensitäten erzeugten 150 bis 1500 Mikrovolt. Mit Hilfe eines rotierenden Sektors überzeugten wir uns davon, daß innerhalb dieses Intensitätsbereichs die Potentiometerausschläge proportional den Lichtintensitäten waren. Wir überzeugten uns ferner davon, daß innerhalb der nutzbaren Bolometer-Fläche die Potentiometerausschläge konstant blieben, wenn bei konstantem Strahl die belichtete Bolometerfläche verkleinert oder vergrößert wurde.

Aus der bolometrischen Messung erhielten wir die Lichtintensität in cal pro Minute. Dividierten wir durch den kalorischen Wert eines Mikromols Quanten (für λ 546 0,052 cal), so erhielten wir die Lichtintensität in Mikromolen Quanten pro Minute, und multiplizieren wir dann mit 22,4, so erhielten wir die Lichtintensität in mm^3 Quanten pro Minute — dem für manometrische Versuche bequemsten Maß der Lichtintensität.

Falls die Lichtstrahlen, wie es in unseren Versuchen der Fall war, *vor* ihrem Eintritt in den Thermostaten bolometrisch gemessen wurden, so war der Intensitätsverlust der Strahlen auf ihrem Weg durch den Thermostaten bis zum Eintritt in die Zellsuspension zu berücksichtigen. Dies geschah mit Hilfe des manometrischen Actinometers, dessen Ausschlag zunächst *außerhalb* des Thermo-

λ [mμ]	$I_{eingestrahlt}$ $\left[\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$	O_2-Verbrauch $\left[\frac{mm^3 O_2}{\text{Minuten}}\right]$	φ $\left[\frac{O_2}{\text{Quanten}}\right]$
578	2,14	1,84	*0,86*
578	10,1	7,68	*0,76*
578	30,6	22,5	*0,74*
578	65,4	45,4	*0,69*

Tab. 1. 3 mg krist. Äthylchlorophyllid, 300 mg Thioharnstoff, 7 cm^3 reines Pyridin. 20°. Gasraum Sauerstoff · k_{O_2} = 1,15. Lichtabsorption vollständig.

λ [mμ]	$I_{eingestrahlt}$ $\left[\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$	O_2-Verbrauch $\left[\frac{mm^3 O_2}{\text{Minuten}}\right]$	φ $\left[\frac{O_2}{\text{Quanten}}\right]$
578	1,03	1,03	*1,0*
578	5,57	5,28	*0,95*
578	11,4	10,4	*0,92*
578	33,1	28,8	*0,87*
578	68,6	58,8	*0,86*
546	1,06	1,09	*1,03*
436	0,93	0,92	*0,99*
436	2,91	2,63	*0,91*
436	7,66	6,73	*0,88*
436	25,9	21,3	*0,82*

Tab. 2. Wie Tab. 1, aber mit Zusatz von 6 mg Piperidin zu 7 cm^3 Pyridin.

staten (in Luft) und dann *innerhalb* des Thermostaten (in Wasser) an der Stelle der Versuchsgefäße gemessen wurde.

7. Actinometer

Da ein Bolometer zur Verfügung stand, haben wir das Actinometer nicht mehr zur absoluten Messung von Lichtintensitäten verwendet, sondern nur noch zum *Vergleich* von Lichtintensitäten. Hierbei hat uns das Actinometer gute Dienste geleistet, z. B. bei der Bestimmung des Lichtverlustes auf dem Weg durch den Thermostaten, wie im vorigen Abschnitt erwähnt; vor allem aber bei der Bestimmung der Lichtabsorption in dünnen Zellsuspensionen.*

Zu diesem Zweck war das Actinometer genauer zu untersuchen. Wir fanden, daß die photochemische Ausbeute kleiner als 1 wird, wenn man über die früher vorgeschriebenen[4] Lichtintensitäten hinausgeht. Wir fanden ferner, daß die photochemische Ausbeute bei Verwendung von reinem Pyridin als Lösungsmittel (reinst Merck) auch bei niedrigen Lichtintensitäten kleiner als 1 ist, daß

* *Zusatz 1961.* Die Absorptionsbestimmung mit dem Actinometer ist seit 1954 ersetzt worden durch die Bestimmung mit der Ulbrichtschen Kugel. Vergl. Beitrag 25 dieses Buchs.

aber bei Zusatz gewisser Basen, wie Piperidin, die Ausbeuten höher werden. Wir fanden ferner, daß man für viele Zwecke das Äthylchlorophyllid durch das leichter erhältliche kristallisierte Phäophorbid ersetzen kann, schließlich, daß die Ausbeuten größer werden, wenn man das Licht in größere Flüssigkeitsvolumina einstrahlt. Einige Beispiele seien in den Tab. 1—3 angeführt.

λ [mμ]	$I_{eingestrahlt}$ $\left[\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$	O_2-Verbrauch $\left[\frac{mm^3\ O_2}{\text{Minuten}}\right]$	φ $\left[\frac{O_2}{\text{Quanten}}\right]$	
546	24,8	17,1	0,69	0,70
546	24,8	17,6	0,71	
546	50,7	35,6	0,70	0,70
546	50,7	35,2	0,70	
546	103	73	0,71	0,71
546	103	73	0,71	

Tab. 3. Großes Gefäß mit Phäophorbid anstatt Chlorophyllid. Gesamtvolumen 120,5 cm³, Flüssigkeitsvolumen 80 cm³ (25 mg Phäophorbid a + b, 4000 mg Thioharnstoff, 100 cm³ reines Pyridin) Gasraum Luft. $20^0 \cdot k_{O_2} = 4{,}46$.

Aus diesen Beispielen sieht man, daß man bei Verwendung großer Flüssigkeitsvolumina, von Luft im Gasraum und von Phäophorbid als lichtabsorbierender Substanz eine bemerkenswerte Unabhängigkeit von der Lichtintensität beobachtet, was für Bestimmungen der Lichtabsorption in dünnen Zellsuspensionen erwünscht ist.

8. Messung der Lichtabsorption

Strahlen wir paralleles Licht vertikal von unten in eine *Chlorella*-Suspension ein, die sich wie bei den manometrischen Messungen der Photosynthese in einem schnell bewegten Kästchen befindet, so verläßt Licht, wenn die Absorption unvollständig ist, das Kästchen zum Teil durch die obere Wand, zum Teil durch die 4 Seitenwände und zu einem zu vernachlässigenden Teil durch die untere Wand. Dabei wird der absorbierte Bruchteil des Lichts außer von dem Pigmentgehalt der *Chlorella* auch von der Zerstreuung des Lichts (wegen des Lichtwegs) und von der Art und der Geschwindigkeit des Schüttelns abhängen. Will man also wissen, wieviel Licht unter den Bedingungen der manometrischen Messungen der Photosynthese von den Zellen absorbiert wird, so muß man die Absorption des Lichts unter den gleichen Bewegungsbedingungen messen, eine Aufgabe, die wir folgendermaßen gelöst haben:

Wir benutzen 2 Quarzgefäße, ein kleineres von 19 cm³ Inhalt und ein größeres von 120 cm³ Inhalt, das eine Einbuchtung hat, in der das kleinere Gefäß befestigt werden kann (Abb. 2).

Das kleinere Gefäß wird mit 7 cm³ Zellsuspension beschickt, dann verschlossen und in der Einbuchtug des größeren Gefäßes befestigt. In das größere Gefäß geben wir 80 cm³ Actinometerlösung (Phäophorbid, Thioharnstoff und Pyridin). Dann verbinden wir das größere Gefäß mit einem Manometer, schütteln es wie die Gefäße bei der Messung der Photosynthese und strahlen Licht von unten in vertikaler Richtung in das kleinere Gefäß ein. Ist die Lichtabsorption in dem

kleineren Gefäß unvollständig, so dringt das nicht absorbierte Licht in die Actinometerlösung ein und erzeugt hier einen Sauerstoffverbrauch, der an dem angeschlossenen Manometer abgelesen wird. Indem man das kleinere Gefäß einmal mit Zellsuspension und einmal mit Wasser beschickt, erhält man 2 manometrische Ablesungen, die, auf gleiche Zeiten bezogen, durch Division die Transmission der bewegten Zellsuspension ergeben.

Es sei hervorgehoben, daß hierbei die Lichtabsorption in dem Actinometergefäß nicht vollständig zu sein braucht; und daß man die photochemische Ausbeute

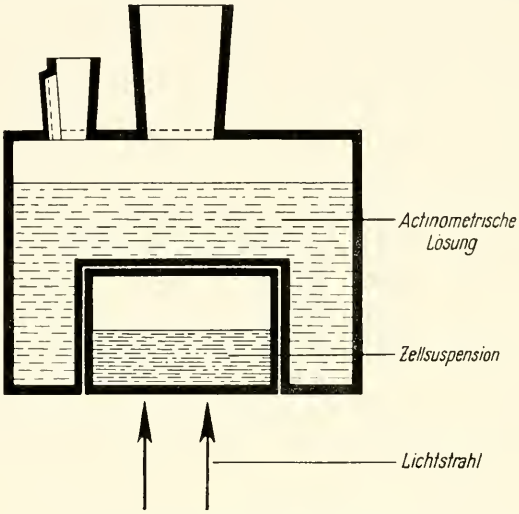


Abb. 2. Transmissions-Actinometer.

der actinometrischen Reaktion nicht zu kennen braucht, ja nicht einmal die Gefäßkonstante des Actinometers, da man nur *Verhältnisse* von Druckänderungen mißt.

Erwünscht aber ist, daß die photochemische Ausbeute der actinometrischen Reaktion unabhängig von der Lichtintensität ist, wovon man sich in jedem Fall durch Einschalten von Neutralgläsern in den Lichtweg überzeuge. Andernfalls muß man die Ausbeute als Funktion der Lichtintensität graphisch darstellen und mit Hilfe einer Kurve das Verhältnis der Drucke korrigieren. Nach den Daten des vorigen Abschnitts ist Phäophorbid + Thioharnstoff, gelöst in reinem Pyridin (Luft im Gasraum) als Actinometerflüssigkeit geeignet.

Beispiele: Kleines Gefäß: 19 cm³ Inhalt, Grundfläche $3{,}5 \times 2{,}1 = 7{,}35$ cm² innere Grundfläche. v_F immer 7 cm³. Größeres Gefäß: $v = 120{,}5$ cm³, $v_F = 80$ cm³. Gasraum Luft. Actinometerlösung 25 mg Phäophorbid a + b, 3000 mg Thioharnstoff, gelöst in 100 cm³ reinstem Pyridin (Merck). $20^0 \cdot k_{O2} = 4{,}46$. Trotz der großen Menge an Actinometerflüssigkeit wurde eine Dunkelreaktion nicht beobachtet. Als Kontrolle gegen Streulicht ist ein zweites Actionmetergefäß zu empfehlen, das neben dem ersten eingehängt, aber nicht belichtet wird (Tab. 4).

9. Versuche in Carbonatgemischen

Wiederum haben wir uns davon überzeugt, daß die photochemische Ausbeute bei der Photosynthese der *Chlorella* in alkalischen Carbonatgemischen viel schlechter ist als in den sauren Medien bei höheren Kohlensäuredrucken. Unser Carbonat-

gemisch bestand aus 85 Vol. $m/10$-$NaHCO_3$ und 15 Vol. $m/10$-$KHCO_3$ (p_H 9,4). Im Gasraum war Luft. Bei einem 1-Minuten-Wechsel von Hell und Dunkel war der Quantenbedarf pro Molekül entwickelten Sauerstoffs etwa 7, während er unter sonst gleichen Bedingungen bei p_H 4,5 und Sättigung mit 10 Vol.-% CO_2-Luft nahezu 1 gewesen wäre. Auch bei unsrer neuen Anordnung also erhält man in Carbonatgemischen nur kleine Bruchteile der maximalen Ausbeute.

Andrerseits haben uns die Carbonatgemische bei der Prüfung methodischer Fragen gute Dienste geleistet, z. B. bei der Prüfung der Frage, ob in den beiden ungleich großen Gefäßen, in denen bei der 2-Gefäß-Methode gleiche Zellmengen in gleichen Flüssigkeitsvolumina bewegt und mit gemessenem Licht belichtet wurden, gleichviel Licht absorbiert wurde. Tatsächlich entwickelte Licht gleicher Intensität in den beiden Gefäßen gleichviel Sauerstoff aus Zellen, die in Carbonatgemisch suspendiert waren, ein Beweis, daß eine der Hauptbedingungen der 2-Gefäß-Methode erfüllt war.

Wellenlängen [mμ]	Zellen im kleinen Gefäß in 7 cm³ [mm³]	Druckänderungen im Licht im großen Gefäß [mm]	Transmission %	Absorption %
436	0	— 20 in 10′	—	—
436	4	— 13 in 10′	65	35
436	8	— 8 in 10′	40	60
436	16	— 7 in 20′	18	82
546	0	— 34 in 5′	—	—
546	50	— 35 in 10′	51,4	48,6
546	100	— 35 in 20′	25,5	74,5
546	200	— 13 in 30′	6,3	93,8
644	0	— 22 in 10′	—	—
644	24,5	— 12,5 in 20′	28,4	71,6
644	49	— 5,5 in 30′	8,3	91,7

Tab. 4. Transmission von *Chlorella*-Suspensionen für 3 Wellenlängen.

Und ferner: Wenn bei der 2-Gefäß-Methode die beiden Gefäße von oben mit weißem Licht (nicht gemessener Intensität) belichtet wurden, so war es oft erwünscht, daß gleichviel Licht in den beiden Gefäßen absorbiert wurde. Wurden nun gleichviel Zellen, in Carbonatgemisch suspendiert, in die beiden Gefäße eingefüllt und im Licht der weißen Lampe bewegt, so war es leicht, die weiße Lampe zwischen den beiden Gefäßen so zu justieren, daß gleichviel Sauerstoff in den beiden Gefäßen entwickelt wurde. Dann war in den beiden Gefäßen die Lichtabsorption gleich.

10. Die 1-Quanten-Reaktion in Grün

Zwei Kästchengefäße der Abmessungen $v = 31{,}23$ $v_F = 7$ cm³ und $v = 20{,}93$ $v_F = 7$ cm³ enthielten je 49 mm³ Zellen, die von der eingestrahlten Wellenlänge

546 48% absorbierten. Der Gasraum enthielt 11 Vol.-% CO_2-Luft; p_H war 4,5. Die Temperatur des Thermostaten war 20°. Die Lichtintensität, die in jedes Gefäß eingestrahlt wurde, betrug 44 mm³ Quanten pro Minute. Die Druckänderungen wurden ohne Unterbrechung der Schüttelung abgelesen. Die Wechselzeiten zwischen Hell und Dunkel betrugen 1,5 Minuten (Tab. 5).

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
k_{O_2} = 2,281 mm²	k_{CO_2} = 2,870 mm²	k'_{O_2} = 1,321 mm²	k'_{CO_2} = 1,910 mm²
mm		mm	
1,5′ hell	+ 0,5	1,5′ hell	+ 1,5
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,0
1,5′ hell	0	1,5′ hell	+ 2,0
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,0
1,5′ hell	+ 0,5	1,5′ hell	+ 1,5
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,5
1,5′ hell	+ 0,5	1,5′ hell	+ 2,0
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,0
1,5′ hell	+ 0,5	1,5′ hell	+ 1,5
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,0
1,5′ hell	+ 0,5	1,5′ hell	+ 2,0
1,5′ dunkel	— 0,5	1,5′ dunkel	— 2,0
Σ 9′ hell	+ 2,5	Σ 9′ hell	+ 10,5
Σ 9′ dunkel	— 3,0	Σ 9′ dunkel	— 12,5
Differenz H =	+ 5,5	Differenz H' =	+ 23,0

$$\frac{H'}{H} = 4{,}18; \qquad \gamma = -1{,}15; \; K'_{O_2} = 6{,}50$$

$$x_{O_2} = 150 \text{ mm}^3$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{h\nu}{O_2} = \frac{9 \cdot 44 \cdot 0{,}48}{150} = \frac{190}{150} = 1{,}27$$

Tab. 5.

In dem gleichen Versuch wurden die gleichen Gefäße in längeren Perioden belichtet und verdunkelt, wobei die Hell- und Dunkelzeiten immer gleich waren. Die Lichtintensitäten waren 44 oder 24 mm³ Quanten pro Minute. Im folgenden sind die beobachteten Druckänderungen angegeben, aus denen mit Hilfe der Daten der Tab. 5 die γ- und $1/\varphi$-Werte berechnet werden können, die in den beiden letzten Stäben der Tab. 6 verzeichnet sind.

Aus Tab. 6 sieht man, daß der Quantenbedarf pro Molekül entwickelten Sauerstoffs oder absorbierter Kohlensäure abnimmt, wenn die Wechselzeit abnimmt und *daß der Quantenbedarf für kurze Wechselzeiten sich dem Wert 1 nähert.* Man sieht ferner, daß die Druckänderungen in den Dunkelzeiten, bezogen auf die Zeiteinheit, ungefähr in demselben Maße bei Verkürzung der Wechselzeiten zunehmen wie die Lichtwirkungen.

Wie groß hierbei die Stoffumsätze sind, erkennt man, wenn man den Gaswechsel mit dem Zellvolumen vergleicht. Im allgemeinen nimmt man an, daß *Chlorella* bei 20° im Dunkeln 100% ihres Zellvolumens an Sauerstoff pro Stunde verbraucht und daß sie bei Sättigung mit Licht etwa 2000% ihres Zellvolumens an Sauerstoff

pro Stunde entwickelt. Hier haben wir im Dunkeln Sauerstoffaufnahmen bis zu 1100% des Zellvolumens pro Stunde und im Licht O_2-Entwicklung bis zu 2000% des Zellvolumens pro Stunde, aber diese O_2-Entwicklung bei einem Quantenbedarf von 1,3 pro Molekül entwickelten Sauerstoffs! Zum Beleg dient Tab. 7, die berechnet ist aus den Daten der Tab. 5 und 6.

Lichtintensitäten (eingestrahlt) $\left[\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$	Wechselzeiten [Minuten]	Druckänderungen Großes Gefäß [mm]	Druckänderungen Kleines Gefäß [mm]	γ $\left[\frac{CO_2}{O_2}\right]$	$\frac{1}{\varphi}$ $\left[\frac{h\nu}{O_2}\right]$
44	1,5	9′ d — 3 9′ h + 2,5 + 5,5	9′ d — 12,5 9′ h + 10,5 + 23,0	— 1,15	*1,27*
44	2,5	12,5′ d — 3,0 12,5′ h + 1,5 + 4,5	12,5′ d — 13,0 12,5′ h + 12,0 + 25,0	— 1,19	*1,4*
44	5,0	15′ d — 4,0 15′ h + 2,0 + 6,0	15′ d — 9,5 15′ h + 7,0 + 16,5	— 1,03	*4,1*
44	7,5	22,5′ d — 4,0 22,5′ h + 3,5 + 7,5	22,5′ d — 10,0 22,5′ h + 8,5 + 18,5	— 0,97	*5,3*
24	5,0	15′ d — 3,5 15′ h + 3,0 + 6,5	15′ d — 9,5 15′ h + 8,0 + 17,5	— 1,02	*2,2*
24	10	30′ d — 5,5 30′ h + 4,0 + 9,5	30′ d — 12,5 30′ h + 9,0 + 21,5	— 0,90	*4,6*

Tab. 6 (49 mm^3 Zellen pro Gefäß).

Quantenintensität eingestrahlt $\left[\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$	Wechselzeit [Minuten]	$\frac{-\ mm^3\ O_2 \text{ dunkel}}{mm^3 \text{ Zellen} \cdot \text{Stdn.}}$ $\left[\frac{mm^3}{mm^3}\right]$ in %	$\frac{+\ mm^3\ O_2 \text{ hell}}{mm^3 \text{ Zellen} \cdot \text{Stdn.}}$ $\left[\frac{mm^3}{mm^3}\right]$ in %	$\frac{1}{\varphi}$ $\left[\frac{h\nu}{O_2}\right]$
44	1,5	1100	2000	*1,26*
44	2,5	850	1830	*1,40*
44	5,0	300	620	*4,1*
44	7,5	222	400	*6,4*
24	5	340	640	*2,2*
24	10	180	310	*4,6*

Tab. 7.

11. Die 1-Quantenreaktion im Grün, bei Kompensation der Atmung mit Weiß

Zwei Kästchen der Abmessungen $v = 20{,}93\, v_F = 7\ cm^3$ und $v = 16{,}59\, v_F = 7\ cm^3$ enthielten je 50 mm^3 Zellen, die von der eingestrahlten Wellenlänge 546 mμ 48% absorbierten. Der Gasraum enthielt Luft mit 11 Vol.-% CO_2. Die Temperatur des Thermostaten war 20°. In jedes Gefäß wurden 19,7 mm^3 Quanten pro Minute von unten eingestrahlt; außerdem brannte in der Mitte über den beiden Gefäßen in 30 cm Entfernung eine 200-Watt-Metallfadenlampe, die die Atmung, aber nicht den durch das Grün erregten Verbrennungsprozeß überkompensierte (vgl. dazu Abschn. 13). Die Wechselzeiten zwischen Hell und Dunkel betrugen 1 Minute.

Nachdem die Versuchsreihe, die in Tab. 8 wiedergegeben ist, beendigt war, wurde die 200-Watt-Lampe über dem Thermostaten ausgelöscht und der Versuch im übrigen wie vorher fortgesetzt, d. h. die Intensität $I = 19{,}7\ mm^3$ Quanten pro Minute, wurde im 1-Minuten-Wechsel eingestrahlt, aber nunmehr nicht im Wechsel gegen Weiß, sondern gegen Dunkel. Wurde 40′ lang intermittiert, so wurde erhalten:

Im großen Gefäß:		Im kleinen Gefäß:	
Σ 20′ dunkel	— 12,5 mm	Σ 20′ dunkel	— 27,5 mm
Σ 20′ hell	+ 15,5 mm	Σ 20′ hell	+ 27,0 mm
Differenz H	+ 28,0	Differenz H'	+ 54,5

$$\frac{H'}{H} = 1{,}94 \qquad = -1{,}07\ K'_{O_2} = 2{,}68$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{hv}{O_2} = \frac{20 \cdot 19{,}7 \cdot 0{,}48}{2{,}68 \cdot 54{,}5} = \frac{189}{146} = 1{,}29$$

Der Versuch zeigt, daß man bei gleicher Wechselzeit für ein gegebenes Lichtinkrement die gleichen Ausbeuten erhält, ob man das Inkrement zu Zellen hinzufügt, deren Atmung durch Weiß kompensiert oder nicht kompensiert ist. In beiden Fällen war $1/\varphi = 1{,}29$.

Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß der negative Druck in den Dunkelminuten beim 1-Minuten-Wechsel von dem durch das Licht induzierten Verbrennungsprozeß herrührt. Die Atmung bei kontinuierlicher Belichtung mit der weißen Lampe war tatsächlich überkompensiert.

12. Die 1-Quantenreaktion im Blau

Zwei Kästchen der Abmessungen $v = 20{,}93\ v_F = 7\ cm^3$ und $v = 16{,}59\ v_F = 7\ cm^3$ enthielten je 50 mm^3 Zellen, die die eingestrahlte Wellenlänge 436 mμ vollständig absorbierten. Der Gasraum enthielt Luft mit 11 Vol.-% CO_2. Die Temperatur des Thermostaten war 20°. In jedes Gefäß wurden 11,7 mm^3 Quanten pro Minute eingestrahlt. Die Wechselzeiten zwischen Hell und Dunkel betrugen 1 Minute.

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
k_{O_2} = 1,321 mm²	k_{CO_2} = 1,910 mm²	k'_{O_2} = 0,915 mm²	k'_{CO_2} = 1,503 mm²
mm		mm	
1′ grün + weiß		1′ grün + weiß	
1′ —	weiß	1′ —	weiß
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	0	1′ — w	— 1,0
1′ g + w	+ 0,5	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 0,5
1′ g + w	+ 1,5	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	0	1′ — w	0
1′ g + w	+ 0,5	1′ g + w	+ 1,5
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 1,0
1′ g + w	+ 1,5	1′ g + w	+ 2,5
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 0,5
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 1,0
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 0,5
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	0	1′ — w	— 0,5
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	0	1′ — w	— 0,5
1′ g + w	+ 1,0	1′ g + w	+ 2,0
1′ — w	— 0,5	1′ — w	— 0,5
Σ 10′ weiß	— 3,0	Σ 10′ weiß	— 6,0
Σ 10′ grün + weiß	+ 10,0	Σ 10′ grün + weiß	+ 20,0
Differenz H	+ 13,0	Differenz H'	+ 26,0

$$\frac{H'}{H} = 2{,}0;\ \gamma = -1{,}1; \qquad K'_{O_2} = 2{,}82$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{v}{O_2} = \frac{10 \cdot 19{,}7 \cdot 0{,}48}{2{,}82 \cdot 26} = \frac{95}{73{,}5} = 1{,}29$$

Tab. 8.

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
k_{O_2} = 1,321 mm²	k_{CO_2} = 1,910 mm²	k'_{O_2} = 0,915 mm²	k'_{CO_2} = 1,503 mm²
mm		mm	
1′ hell	+ 1,5	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 0,5	1′ dunkel	— 1,0
1′ hell	+ 0,5	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 0,5	1′ dunkel	— 1,0
1′ hell	+ 0,5	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 1,0	1′ dunkel	— 2,0
1′ hell	+ 1,0	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 0,5	1′ dunkel	— 1,5
1′ hell	+ 1,0	1′ hell	+ 1,0
1′ dunkel	— 1,0	1′ dunkel	— 1,5
1′ hell	+ 0,5	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 1,0	1′ dunkel	— 2,0
1′ hell	0	1′ hell	+ 1,0
1′ dunkel	— 0,5	1′ dunkel	— 1,5
1′ hell	+ 1,0	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	— 0,5	1′ dunkel	— 2,5
1′ hell	0	1′ hell	+ 1,5
1′ dunkel	0	1′ dunkel	— 1,0
1′ hell	0	1′ hell	+ 1,0
1′ dunkel	— 1,5	1′ dunkel	— 2,0
Σ 10′ dunkel	— 7,0	Σ 10′ dunkel	— 16,0
Σ 10′ hell	+ 6,0	Σ 10′ hell	+ 13,5
Differenz H	+ 13,0	Differenz H'	+ 29,5

$$\frac{H'}{H} = \frac{29{,}5}{13{,}0} = 2{,}26;\ \gamma = -1{,}2; \qquad K'_{O_2} = 3{,}44$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{hv}{O_2} = \frac{10 \cdot 11{,}7}{3{,}44 \cdot 29{,}5} = \frac{117}{102} = 1{,}15$$

Tab. 9.

Aus Tab. 9 sieht man, daß der Quantenbedarf pro Molekül entwickelten Sauerstoffs 1,15 und pro Molekül fixierter Kohlensäure 1 war. Dies ist eine Bestätigung der Ergebnisse der Tab. 5, aber nunmehr für eine Wellenlänge, von der man bisher annahm, daß sie wegen ihrer teilweisen Absorption durch die Carotinoide bei der Photosynthese wesentlich unwirksamer sei als Grün. Wahrscheinlich ist früher der Lichtverlust auf dem Thermostatenweg zu klein angenommen worden, den man heute mit Hilfe des manometrischen Actinometers genau bestimmen kann.

Das Ergebnis ist weiterhin willkommen, weil hier die Lichtabsorption vollständig war, während für die gleichen Zellmengen und die grüne Linie 546 mμ die Lichtabsorption nur etwa 50% betrug. Fehler in der Absorptionsmessung, an die man vielleicht — nach den ungünstigen Erfahrungen mit früheren Methoden der Licht-Absorptionsmessung in Zellsuspensionen — hätte denken können, haben also bei unserem Ergebnis $1/\varphi = 1$ nicht mitgewirkt.

Außer den Wellenlängen 546 und 436 haben wir die Cadmiumlinie 644 mμ geprüft. Dieselben Erscheinungen, insbesondere der Quantenbedarf 1 für die Lichtreaktion, wurden gefunden.

13. Der Kreisprozeß

Aus Tab. 8 geht hervor, daß beim Wechsel Grün → Weiß im weißen Licht ein Teil des Sauerstoffs wieder verlorengeht, der in Grün + Weiß entwickelt wurde. Wieviel Sauerstoff bleibt bei diesem Kreisprozeß als bleibender Gewinn übrig?

Zur Berechnung ist nicht nur die Kenntnis des Gaswechsels im Wechsellicht notwendig, sondern es muß auch der Gaswechsel im kontinuierlichen weißen Licht ohne Grün-Zusatz bekannt sein. Werden z. B. im kontinuierlichen weißen Licht in 10 Minuten a mm³ Sauerstoff entwickelt und im Wechsellicht (1′ hell, 1′ dunkel) in der gleichen Zeit b mm³, so ist der bleibende Gewinn an Sauerstoff, den der Grün-Zusatz bewirkt, $b—a$ und der Quantenbedarf dieses Gewinns:

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{5 \cdot I}{b - a},$$

wo I die absorbierte Quantenintensität des Grün-Zusatzes in mm³ Quanten/Minuten ist und 5 die Summe der Zeiten der 5 Belichtungsperioden mit dem Inkrement.

Gemäß Tab. 8 war im Wechsellicht bei einer Absorption des Inkrements $= 19{,}7 \times 0{,}48 = 9{,}5$ mm³ Quanten pro Minute:

Im großen Gefäß		Im kleinen Gefäß	
Σ 10′ weiß	— 3 mm	Σ 10′ weiß	— 6 mm
Σ 10′ weiß + grün	+ 10 mm	Σ 10′ weiß + grün	+ 20 mm
Positiver Druck im Wechsellicht	+ 7 mm	Positiver Druck im Wechsellicht	+ 14 mm,

wobei man beachte, daß hier anders als bei der Berechnung der Lichtreaktion die beiden Zahlen nicht subtrahiert werden dürften, sondern addiert werden müssen.

In dem gleichen Versuch wurde bei kontinuierlicher Belichtung mit Weiß gefunden:

	Im großen Gefäß	Im kleinen Gefäß
80′ *vor* Wechsellicht	+ 20,0 mm	+ 30,0 mm
10 *nach* Wechsellicht	+ 2,5 mm	+ 3,5 mm
90′ kontinuierlich	+ 22,5 mm	+ 33,5 mm
Also 20′ kontinuierlich	+ 5,0 mm	+ 7,4 mm

Also Gewinn durch

das Inkrement 10′ $H = +7-5 = +2$ mm $\qquad H' + 14 - 7{,}4 = +6{,}6$ mm

$x_{O_2} = +29{,}8$ mm³

$x_{CO_2} = -39{,}8$ mm³

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{h\nu}{O_2}\,\frac{10 \cdot 9{,}5}{29{,}8} = 3{,}2.$$

In einem andern Versuch wurde erhalten: 644 mμ. Je 43 mm³ Zellen pro Gefäß, die 88% des eingestrahlten Lichts absorbierten.

1-Minuten-Wechsel von Rot der Intensität $I = 36{,}2$ mm³ Quanten pro Minute und Rot der Intensität 18,4 mm³ Quanten pro Minute. Differenz also 17,8 mm³ Quanten pro Minute.

Druckänderungen

	Im großen Gefäß ($v = 20{,}93$; $v_F = 7$)	Im kleinen Gefäß ($v = 16{,}59$; $v_F = 7$)
Σ 10′ kleine Intensität	— 0,5 mm	— 4,5 mm
Σ 10′ große Intensität	+ 7,0 mm	+ 17,5 mm
Positiver Druck in 20′	+ 6,5 mm	+ 13,0 mm
20′ kontinuierlich . . .	0 mm	+ 0,5 mm
Kleine Intensität . . .		
Gewinn in 20′	+ 6,5 mm	+ 12,5 mm

$$\frac{H'}{H}\ 1{,}92; \qquad \gamma = -1{,}04;\ K_{O_2} = 2{,}6$$

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{h\nu}{O_2} = \frac{10 \cdot 17{,}8 \cdot 0{,}88}{2{,}6 \cdot 12{,}5} = \frac{156}{32{,}6} = 4{,}8.$$

Indessen sind diese Messungen des Sauerstoffgewinns in dem vollständigen Kreisprozeß wesentlich ungenauer als die Messungen der Sauerstoffentwicklung in der Lichtreaktion, die sich einfach aus der Differenz der Hell- und Dunkelausschläge beim Intermittieren ergibt. Zur Berechnung des Gewinns im Kreisprozeß sind „kontinuierliche Werte" notwendig, die sich im weißen kompensierenden Licht schnell, im Dunkeln aber langsamer nach Unterbrechung des Intermittierens einstellen. Wir müssen es heute bei einem Mittelwert von 4 mit Schwankungen bis 3 und 5 bewenden lassen.

14. Der Energieumsatz

Nach der Entdeckung des Kreisprozesses sind drei Arten von Energieumsätzen zu unterscheiden: der Energieumsatz in der Lichtreaktion, der Energieumsatz in der durch das Licht induzierten Dunkelreaktion und der Energieumsatz im vollständigen Kreisprozeß. Von einer vierten Art von Energieumsatz, dem ökonomischen, wollen wir hier absehen, weil er von unübersehbaren äußeren Faktoren abhängt.

Offenbar fehlen zur Zeit die Unterlagen, um den Energieumsatz in der Lichtreaktion oder in der Dunkelreaktion zu berechnen; ja man wird sogar nunmehr alle früheren Berechnungen von photosynthetischen Energieumsätzen — sowohl unsere eigenen wie die anderer — revidieren müssen.

Am ehesten wird man den Energieumsatz für den vollständigen Kreisprozeß berechnen können, nämlich dann, wenn der Quantenbedarf pro Molekül entwickelten Sauerstoffs genauer bestimmt worden ist.

Literatur

1 Vgl. Burk D., und Warburg, O.. Naturwiss. 37 (1950) 560.
2 Warburg, O. und Burk, Dean, Arch. Biochemistry 25 (1950) 410.
3 Myers, Jack. Photosynthesis in Plants. Ames (Iowa) 1949.
4 Warburg O.. uud Schocken, Victor, Arch. Biochemistry 21 (1949) 363.

12 Ein-Quanten-Mechanismus der Photosynthese*

Von Otto Warburg

Beschreibung der Entdeckung des Kreisprozesses bei der Photosynthese: der Lichtreaktion, in der pro Mol absorbierter Quanten 1 Mol Sauerstoff entwickelt wird; und der Dunkelreaktion, in der $^2/_3$ bis $^3/_4$ des entwickelten Sauerstoffs wieder zurückreagiert. Die Bilanz des Kreisprozesses ist also ein bleibender Gewinn von 1 Mol Sauerstoff, wenn 3 bis 4 Mole Quanten absorbiert worden sind.

Das Quantenproblem der Photosynthese kann kurz folgendermaßen formuliert werden: zur Entwicklung von 1 Mol Sauerstoff aus Kohlensäure sind etwa 112000 cal erforderlich. Die Energie von 1 Mol Quanten an der Wirkungsgrenze im Rot beträgt nur 42000 cal. Also kann die Photosynthese aus thermodynamischen Gründen keine 1-Quanten-Reaktion sein. Andererseits sind in der Photochemie des Unbelebten Mehr-Quanten-Reaktionen nicht bekannt, und wir können uns auch keinen Mechanismus derartiger Reaktionen vorstellen.

Ich habe im letzten Jahr in Dahlem mit meinem amerikanischen Kollegen Dean Burk über dieses Problem gearbeitet[1]. Wir glauben die Lösung gefunden zu haben. Trotz aller Gegengründe hat sich gezeigt, daß die Photosynthese eine 1-Quanten-Reaktion ist, das heißt, daß 1 Mol absorbierter Lichtquanten die Entwicklung von 1 Mol Sauerstoff und die Absorption von 1 Mol Kohlensäure bewirkt. Aber auch hier ist kein *Maxwell*scher Dämon am Werke, der die Gesetze der Thermodynamik durchbricht. Denn die dem Lichtquantum fehlende Energie von 70000 cal pro Mol wird der Photosynthese von der Zelle in Form von chemischer Energie zur Verfügung gestellt. In dem Maß, in dem diese chemische Hilfsenergie in der Photosynthese verbraucht wird, wird sie immer wieder regeneriert, und zwar durch die Energie eines Verbrennungsvorgangs, in dem Produkte der Photosynthese zurückreagieren. Die Lösung des Problems ist also eine chemische Hilfsmaschine, deren Besonderheit es ist, daß sie die Photosynthese treibt und selbst von den Produkten der Photosynthese getrieben wird.

Wie ist dies gefunden worden?

1. Methoden

Wir messen die Photosynthese manometrisch mit Gefäßen, die in Abbildung 1 abgebildet sind. Sie enthalten eine Suspension der Grünalge Chlorella, im Gasraum 10 Vol-% Kohlensäure und Luft und werden, mit Manometern verbunden, im Thermostaten so schnell hin und her bewegt, daß die Flüssigkeit in eine schwingende Bewegung gerät und Gas- und Flüssigkeitsphasen immer nahezu im Gleichgewicht sind.

Das Licht tritt von unten in die Gefäße ein; seine Intensität wird mit einem Großflächenbolometer gemessen, das den ganzen Querschnitt des Lichtstrahls aufnimmt, so daß die meist fehlerhaften Integrationen über die Strahlungsquerschnitte

---

* Aus „Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie“ 55 (1951): 447.

vermieden werden. Das Bolometer wurde mit Energie-Standard-Lampen des amerikanischen Bureau of Standards geeicht.

Belichten wir die Gefäße, so wird Kohlensäure von den Algen absorbiert und ein etwa gleiches Volumen Sauerstoff entwickelt. Trotzdem entsteht bei der Belichtung ein Druck, und zwar ein positiver, weil Sauerstoff in Wasser schwerer löslich ist als Kohlensäure. Unsere manometrische Methode beruht also auf der verschiedenen Löslichkeit von Sauerstoff und Kohlensäure, und deshalb müssen die Gefäße verhältnismäßig viel Flüssigkeit enthalten.

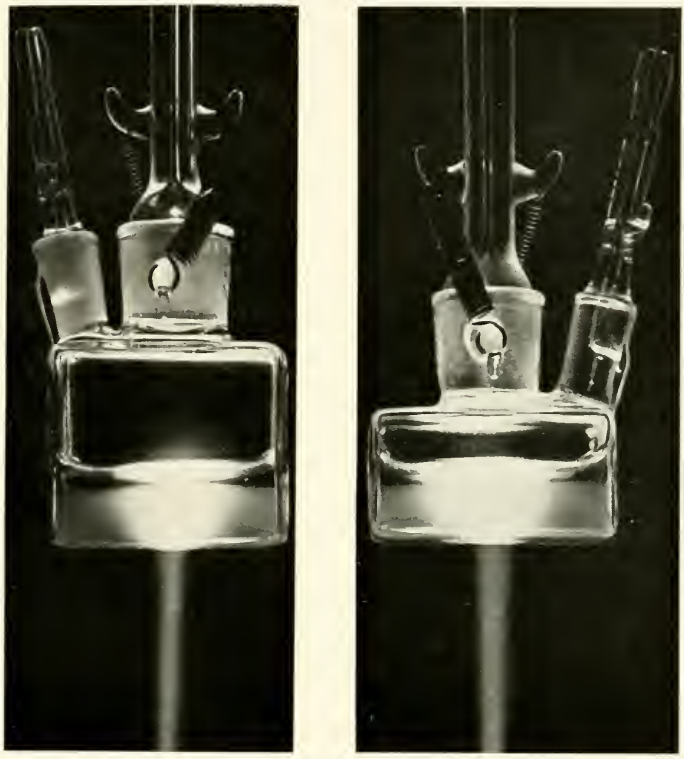


Abb. 1. Gefäßpaar mit Zellsuspension.
Ungleiches Volumen der Gasräume

Zwei Gefäße sind notwendig, weil wir nur mit Hilfe von zwei Gefäßen die notwendigen Gleichungen erhalten, um aus der Änderung des Gesamtdrucks die Änderungen der Partialdrucke des Sauerstoffs und der Kohlensäure berechnen zu können. Dabei muß das Volumen des Gasraums in den beiden Gefäßen verschieden sein, aber alles andere muß für die beiden Gefäße gleich sein: die Konzentration der Zellen, die Intensität des einfallenden Lichtstrahls, die Geschwindigkeit der Bewegung. Liest man dann die Druckänderungen in den beiden Gefäßen gleichzeitig ab, zum Beispiel von Minute zu Minute, so erhält man von Minute zu Minute die Sauerstoffentwicklung und die Kohlensäurefixierung bei der Photosynthese.

Nicht minder einfach ist heute die früher gefürchtete Messung der Lichtabsorption in dem trüben Medium der Zellsuspensionen. Unseren früheren Ausweg,

die vollständige Lichtabsorption, haben wir verlassen wegen der unphysiologisch hohen Zellkonzentrationen, die zur vollständigen Lichtabsorption notwendig sind. Heute messen wir die Photosynthese für Zellsuspensionen, die so dünn sind wie bei der Kultur der Zellen, also unter vollständig physiologischen Bedingungen. Solche Suspensionen absorbieren im Grün nur 20% des eingestrahlten Lichts, der Rest tritt als breiter Streukegel aus der Zellsuspension wieder aus. Dieses Streulicht also war zu messen, und zwar nicht für ruhende, sondern für bewegte Zellsuspensionen, da die Lichtabsorptionsbedingungen identisch sein mußten mit den Bedingungen bei den manometrischen Messungen der Photosynthese.

Abb. 2. Transmissions-Aktinometer

Die Methode wurde auf der Grundlage unsres manometrischen Aktinometers entwickelt, in dem Chlorophyll, gelöst in Pyridin, bei Belichtung Sauerstoff auf Thioharnstoff überträgt. Ist die Lichtintensität nicht zu hoch, so ist die Ausbeute bei dieser Photooxydation nahezu 1 O_2 : 1 $h \cdot \nu$.

Ein kleines Gefäß (Abb. 2), das die Zellsuspension enthält und Form und Grundfläche der Manometergefäße hat, wird von einem großen Gefäß, das die Aktinometerflüssigkeit enthält, umgeben und in ihm befestigt. Beide Gefäße zusammen werden im Thermostaten schnell bewegt, wobei das Licht, wie aus der Abbildung ersichtlich, in das kleine Gefäß eindringt. Was davon in der Zellsuspension nicht absorbiert wird, verläßt als Streukegel das kleine Gefäß, dringt nach allen Richtungen in das große Gefäß ein, wird hier absorbiert und erzeugt einen dem absorbierten Licht äquivalenten Sauerstoffverbrauch. (Um den Strahlengang im Aktinometer sichtbar zu machen, ist in der Abbildung die Konzentration der fluoreszierenden Aktinometerflüssigkeit kleiner als beim Versuch.)

Bei der praktischen Anwendung macht man zunächst eine erste Messung, wenn das kleine Gefäß Wasser enthält, und dann eine zweite Messung, wenn das kleine Gefäß Zellen enthält. Sind die Lichtintensitäten und die Belichtungszeiten beide Male gleich, so ist das Verhältnis der aktinometrischen Druckänderungen direkt gleich der Lichttransmission der Zellsuspension.

Neben Manometrie, Bolometrie und Aktinometrie war eine 4. Methode wichtig, die Kompensation der Zellatmung. Heute bestimmen wir die Ausbeute bei der Photosynthese nicht mehr in einem verdunkelten Raum, sondern im Licht einer

dauernd zwischen den beiden Gefäßen brennenden Nitralampe, deren Aufgabe es ist, die Atmung der Zellen durch Photosynthese gerade zu kompensieren. Die Intensität der Nitralampe wird nicht gemessen. Zu ihrem dauernd wirkenden Licht fügen wir den gemessenen Lichtstrahl hinzu und bestimmen so die Zunahme der Lichtwirkung für die Zunahme der Lichtintensität. Diese Methode verhindert den Substanzverlust der Zellen während der Versuche und stabilisiert dadurch die Versuchsbedingungen in einem solchen Maß, daß man heute die Versuche beliebig lange ausdehnen kann, während man sie früher nach kurzer Zeit wegen Absinkens der Ausbeute abbrechen mußte.

Noch aus einem andern Grund ist die Kompensierung der Atmung von Bedeutung. Solange die Atmung nicht kompensiert war, waren die gemessenen Ausbeuten keine wahren thermodynamischen Gewinne, sondern ganz oder teilweise nur verhinderte Atmungsverluste, die das Licht arbeitslos, etwa durch Antikatalyse, hätte bewirken können. Heute, wo wir von dem Niveau der kompensierten Zellatmung ausgehen, liegen alle unsre Druckänderungen im positiven Druckgebiet, und alle unsre Ausbeuten sind wahre thermodynamische Gewinne.

Die vollständige Versuchsanordnung wird nunmehr leicht verständlich sein. Quecksilber-Hochdrucklampen mit oder ohne Kadmiumzusatz waren die Lichtquellen, aus denen ein Strahlenbündel isoliert und mit vier total reflektierenden Prismen in zwei parallele Strahlenbündel aufgeteilt wurde. Zwei Beobachter waren notwendig, die auf zwei Seiten des Thermostaten die Druckänderungen in den beiden Gefäßen gleichzeitig ablasen. Die Versuchszeiten waren 1 Minute bis 9 Stunden. Selbst in den längsten Versuchen war am Ende die Ausbeute nicht gesunken. Die Genauigkeit war in langen Versuchen, bei denen die manometrischen Ausschläge bis zu 100 mm betrugen, mehr als ausreichend. In kurzen Versuchen waren die Ablesefehler groß, aber wenn man viele kurze Perioden aufeinander folgen ließ und die Mittelwerte bildete, war die Genauigkeit auch für kurze Perioden ausreichend. Mit Differentialmanometer und Kathetometer kann man die Ablese-Genauigkeit steigern. Aber es lohnte sich nicht, auf Kosten der Einfachheit an Genauigkeit zu gewinnen.

2. Die Hinreaktion und die Rückreaktion

Ich möchte nunmehr einige Versuche in graphischer Darstellung zeigen. Die Ausbeute nennen wir φ und verstehen darunter Mole Sauerstoff entwickelt/Mole Quanten absorbiert. Der reziproke Wert $\frac{1}{\varphi}$ ist dann der Quantenbedarf, Mole Quanten absorbiert/Mole Sauerstoff entwickelt.

In der Abbildung 3 sind die beobachteten Druckänderungen als Funktion der Zeit eingetragen. Die Atmung der Zellen war durch weißes Licht kompensiert. In Zeitintervallen von 3 Minuten wurde gemessenes Licht der grünen Quecksilberlinie hinzugefügt und wieder fortgenommen. Die Druckänderungen wurden von Minute zu Minute abgelesen. Die Unregelmäßigkeiten rühren von Ablesungsfehlern her, deren Größe Sie nach dieser Abbildung beurteilen können. Bilden wir, um die Fehler zu verkleinern, die Mittelwerte aller korrespondierenden Minuten

und zeichnen die Kurve mit den Mittelwerten, so erhalten wir die Kurve der Abbildung 4.

Wie man sieht, steigt der Druck bei Zugabe des grünen Lichts und sinkt der Druck bei Fortnahme des grünen Lichts. Doch bleibt nach Ablauf einer jeden Welle ein positiver Rest übrig, der sich hier nach Ablauf von 5 Perioden auf 7 mm summiert hat. Dieser Rest ist der Gewinn bei der Photosynthese, von dem ich

Abb. 3. Beobachtete Druckänderungen bei 3-Minuten-Wechsel von (Grün + Weiß) und Weiß. Weiß dient zur Kompensierung der Zellatmung

Abb. 4. Mit den Mittelwerten der Kurve der Abbildung 3 gezeichnet

später zeigen werde, wie er genauer bestimmt wird. Die hier gefundenen 7 mm Rest bedeuten einen Quantenbedarf von 4,5 Molen pro Mol entwickelten Sauerstoffs.

Betrachten wir nunmehr eine der 5 Perioden genauer, wozu ein in größerem Maßstab gezeichnetes Bild einer einzelnen Periode dienen soll (Abb. 5). Bei Zugabe des grünen Lichts steigt der Druck zunächst schnell, dann langsamer an. Bei Fortnahme des grünen Lichts fällt der Druck zunächst schnell, dann langsamer wieder ab. Es ist das typische Bild des Zusammenspiels zweier chemischer Reaktionen, von denen die eine die Rückreaktion der anderen ist. Tatsächlich ergibt sich, wenn man die hier nicht eingezeichneten gleichzeitigen Druckänderungen im zweiten Gefäß berücksichtigt, daß die Rückreaktion genau die Umkehr der Hinreaktion ist. In der Hinreaktion wird Sauerstoff entwickelt und Kohlensäure absorbiert, in der Rückreaktion wird Kohlensäure entwickelt und Sauerstoff absorbiert. In beiden Richtungen ist das Verhältnis $CO_2/O_2 = -1{,}17$.

Lassen Sie uns nunmehr die Geschwindigkeit der Hinreaktion, also der Lichtreaktion, an zwei Punkten bestimmen: am Anfang der aufsteigenden Kurve, wo noch keine Gegenreaktion vorhanden ist, und am Ende der aufsteigenden Kurve, wo die Gegenreaktion voll entwickelt ist. Die Bestimmung mit Hilfe der eingezeichneten Tangenten ergibt, daß die Geschwindigkeiten der Hinreaktion am Anfang und am Ende der aufsteigenden Kurve nahezu gleich sind. Dividiert man durch die absorbierte Quantenintensität des grünen Lichts, so ergibt sich hier, daß der Quantenbedarf für die Entwicklung von 1 Mol Sauerstoff am Anfang der Kurve 1,0 und am Ende der Kurve 1,25 ist, also bei Berücksichtigung der Meß-

fehler, daß der Quantenbedarf für die Entwicklung von 1 Mol Sauerstoff im ganzen Verlauf der Kurve nahezu 1 ist.

Man beachte, daß das Ziehen der Tangente am Anfang der aufsteigenden Kurve nur eine Korrektion bedeutet, daß also der Quantenbedarf von nahezu 1 hier tatsächlich direkt gemessen wird und daß man die Genauigkeit der Messung beliebig vergrößern kann, wenn man die Zahl der Perioden, die zur Bildung des Mittelwerts dienen, vergrößert. Dies ist die Antwort auf mehrfache Fragen, ob die Ausbeute 1 tatsächlich gemessen worden sei oder ob sie nur unter irgend welchen Annahmen berechnet worden sei.

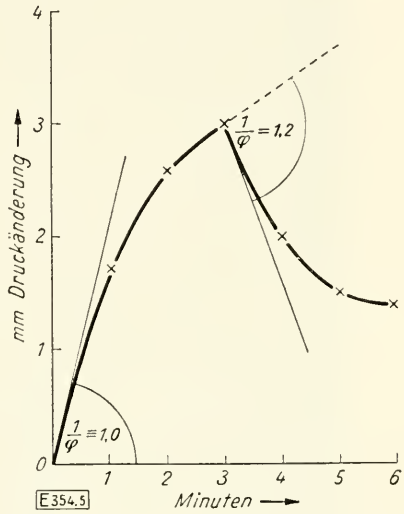


Abb. 5. Eine Periode der Kurve der Abbildung 4. Graphische Bestimmung des Quantenbedarfs $\frac{1}{\varphi} = \frac{h \cdot \nu}{O_2}$

Indessen muß erwähnt werden, daß die Lichtintensitäten nicht beliebig hoch sein dürfen, was wegen der Beteiligung von Dunkelreaktionen an der Photosynthese selbstverständlich erscheinen mag. In dem gezeigten Versuch war die Intensität des eingestrahlten grünen Lichts zwei Mikromole Quanten pro Minute, 17% davon wurden in der Zellsuspension absorbiert. Im Blau, das von der gleichen Zellsuspension vollständig absorbiert werden würde, müßte dann die eingestrahlte Intensität entsprechend niedriger sein. Berücksichtigt man dies, so wird man unabhängig von der Wellenlänge immer die Ausbeute von nahezu 1 finden. Dies wurde festgestellt für die blaue, die grüne und die gelbe Quecksilberlinie sowie für die rote Kadmiumlinie.

3. Kontinuierliche Belichtung

Belichtet man nicht intermittierend, sondern kontinuierlich, so stellt sich ein stationärer Zustand zwischen Hinreaktion und Rückreaktion ein, in dem nunmehr alle Geschwindigkeiten, also auch die Geschwindigkeit der Rückreaktion, konstant sind. Diese konstante Geschwindigkeit der Rückreaktion kann gemessen werden, indem man verdunkelt, die zeitliche Abnahme des Druckes im Dunkeln mißt und für die Verdunklungszeit Null extrapoliert, wie dies in Abbildung 6 durch die

Ziehung der Tangente geschehen ist. Kennen wir außerdem die absorbierte Lichtintensität, so haben wir alle Daten, um die Ausbeute in der Lichtreaktion während der kontinuierlichen Belichtung zu berechnen. In dem hier dargestellten Beispiel finden wir die Ausbeute 1.

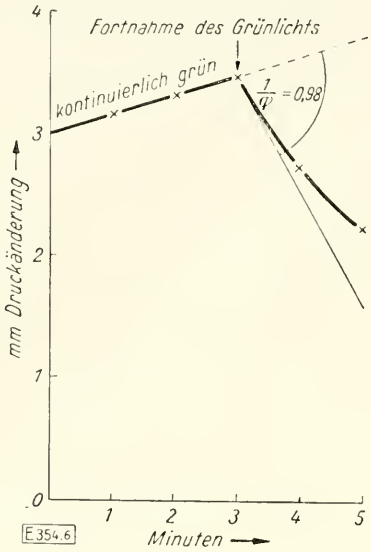


Abb. 6. Quantenbedarf $\frac{1}{\varphi} = \frac{h \cdot \nu}{O_2}$ der Lichtreaktion bei kontinuierlicher Belichtung

Ob man also intermittierend oder kontinuierlich belichtet, immer läßt sich zeigen, daß die Photosynthese aus zwei Komponenten besteht: aus der Lichtreaktion, die eine 1-Quanten-Reaktion ist, und aus der Rückreaktion, die eine Verbrennungsreaktion ist.

4. Entfernung des Sauerstoffs

Von den mannigfachen Konsequenzen haben wir eine, die uns besonders wesentlich erschien, geprüft. Wäre es möglich, den in der Lichtreaktion der Photosynthese entstehenden Sauerstoff schneller zu entfernen, als er in der Rückreaktion reagieren kann, so müßte die Photosynthese zum Stillstand kommen.

Abbildung 7 zeigt unser Versuchsgefäß, das im Hauptraum die Zellsuspension enthällt, im Gasraum 5% Kohlensäure und Stickstoff und in den Ansatzbirnen gelben Phosphor zur Absorption des Sauerstoffs. Die Photosynthese wird hier durch die Absorption der Kohlensäure gemessen, erzeugt also am Manometer eine negative Druckänderung.

Wurden die so vorbereiteten Gefäße zunächst 30 Minuten im verdunkelten Thermostaten schnell geschüttelt und dann mit unsern üblichen Lichtintensitäten belichtet, so konnte keine Photosynthese nachgewiesen werden. Wurde 5- bis 10mal stärker belichtet, so traten allmählich negative Drucke auf, die, wenn sie stationär geworden waren, einem Quantenbedarf von 100 bis 200 pro Mol fixierter Kohlensäure entsprachen. Wurden die Phosphorstäbe herausgenommen und in den

Gasraum Kohlensäure und Luft gefüllt, so erschien wieder die normale Photosynthese.

Entfernung des Sauerstoffs hemmt also die Photosynthese, bei mittleren Lichtintensitäten vollständig, bei hohen Lichtintensitäten auf etwa $^1/_{100}$ des Normalwerts; woraus man schließen muß, daß Sauerstoff, der ein Produkt der Photosynthese ist, zur Unterhaltung der Photosynthese notwendig ist.

Abb. 7. Gefäß zur Herstellung anaerober Bedingungen. In den Ansatzbirnen gelber Phosphor

5. Gewinn bei der Photosynthese

Als letzter Versuch sei eine Gewinnbestimmung gezeigt (Abb. 8), bei dem auf der Zeitachse nunmehr nicht Minuten, sondern Stunden aufgetragen sind. Die Zellatmung war durch weißes Licht überkompensiert. Grünes Licht der Quecksilberlinie 546 mμ wurde vier Stunden lang in 1-Minuten-Abständen hinzugefügt und wieder fortgenommen. Dem Zweck des Versuchs entsprechend wurden hier nicht die Druckwellen in den 1-Minuten-Perioden abgelesen, sondern es war nur notwendig, die von den Manometern summierten Gewinne von Stunde zu Stunde abzulesen.

Die untere Kurve zeigt die Druckänderungen in dem großen Gefäß und die obere Kurve die Druckänderungen in dem kleinen Gefäß. Aus dem Verhältnis der Neigungen der beiden Kurven gegen die Zeitachse ergibt sich das Verhältnis von Kohlensäureabsorption zu Sauerstoffentwicklung, das im ganzen Verlauf des Versuchs —1,15 war. Die durch das grüne Licht in den beiden Gefäßen erzeugten Drucke waren in 4 Stunden +18,5 und +39 mm und also so groß, daß die Gewinne genau berechnet werden konnten. Es ergab sich im Mittel für den Gewinn ein Quantenbedarf von 4,2 Molen Quanten pro Mol entwickelten Sauerstoffs und von 3,65 Molen Quanten pro Mol fixierter Kohlensäure. Der niedrigste Quanten-

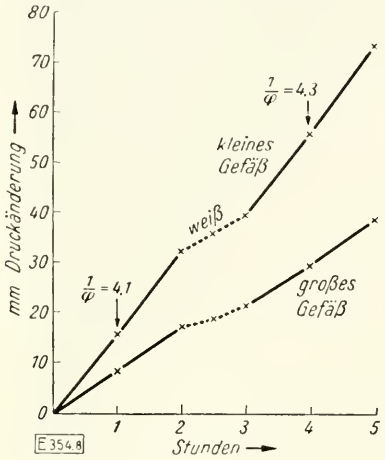


Abb. 8. Gewinnbestimmung

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{h \cdot \nu}{O_2} = \text{Quantenbedarf des Gewinns}$$

bedarf, den wir in sicheren Versuchen gefunden haben, war 3,5 Mole Quanten pro Mol entwickelten Sauerstoffs. Dies bedeutet im Rot einen Gewinn an chemischer Energie von 76% der absorbierten Lichtenergie.

Dies ist eine Bestätigung der Ergebnisse von 1923, daß bei der Photosynthese der größere Teil der absorbierten Lichtenergie — unter günstigen Umständen — als chemische Energie gewonnen werden kann. Aber heute haben wir die Erklärung. 1 Mol Quanten entwickelt 1 Mol Sauerstoff. $^3/_4$ Mole Sauerstoff reagieren zurück. $^1/_4$ Mol Sauerstoff bleibt übrig. Also bleibt $\frac{1}{1}$ Mol Sauerstoff übrig, wenn 4 Mole Quanten absorbiert worden sind; und entsprechend, wenn der Quantenbedarf 3,5 Mole ist, wobei man beachte, daß der Quantenbedarf pro Mol Sauerstoff nicht ganzzahlig zu sein braucht.

6. Mechanismus der Photosynthese

Wenn als Ergebnis von Lichtreaktion und Rückreaktion bei der Photosynthese Energiegewinne bis zu 76% der absorbierten Lichtenergie erhalten werden, so ist die Bilanz der Photosynthese sicherlich nicht in Widerspruch mit den Gesetzen der Thermodynamik. Wie aber ist es, wenn wir die Lichtreaktion gesondert betrachten, in deren Beginn, wie wir gesehen haben, der Sauerstoff mit der Quanten-Aus-

beute 1 entwickelt wird, das bedeutet, mit einer Energieausbeute von 270% der absorbierten Lichtenergie?

Stellt man sich auf den Standpunkt, daß so wenig in der Bilanz, so wenig in irgendeiner Phase der Photosynthese etwas geschehen darf, was der Thermodynamik widerspricht, so folgt, daß im Licht der größere Teil der wirkenden Energie nicht Lichtenergie sein kann, sondern chemische Energie sein muß, die der Photosynthese von der Zelle zur Verfügung gestellt wird.

Der Träger dieser Hilfsenergie muß im Licht seine Energie mit der absorbierten Lichtenergie vereinigen. Ist dann durch die vereinigten Energien die Kohlensäure reduziert und der Sauerstoff entwickelt worden, so erhält der Träger der Hilfsenergie von der nun einsetzenden Verbrennungsreaktion seine aufgewendete Energie zurück, und das Spiel kann von neuem beginnen.

Man beachte, daß dieser Kreisprozeß, der die Photosynthese erst ermöglicht, seinerseits durch die Produkte der Photosynthese unterhalten wird. Man beachte ferner, daß bei diesem Kreisprozeß die Hilfsenergie abwechselnd in Form von Trägerenergie und von Verbrennungsenergie vorliegt und daß bei diesem Oszillieren der freien Energie nur wenig Energie als Wärme verloren werden darf: in der Tat nur etwa 12% bei jedem Kreislauf, wenn der Gewinn der Photosynthese die gefundenen 76% erreichen soll. Denkt man an das Phosphagen im Muskel, das hier nach EINAR LUNDSGAARD[2] fast ohne Energieverlust durch die freie Energie einer Gärung immer wieder regeneriert wird, so wird man nicht sagen können, daß der Kreisprozeß bei der Photosynthese ohne Analogie in der lebenden Natur ist.

Fragt man nun nach der chemischen Natur des Trägers der Hilfsenergie, so weisen zwei Tatsachen in eine bestimmte Richtung. Gibt man zu einer Suspension von Chlorella eine sehr kleine Menge Arsensäure, so sinkt die photochemische Ausbeute, zum Beispiel auf $^1/_2$ oder $^1/_4$ des Normalwerts, und steigt wieder auf den Normalwert, wenn man die Arsensäure aus den Zellen wieder entfernt. Arsensäure aber ist eine Substanz, die — übrigens durch einen wohlbekannten chemischen Mechanismus — die Bildung des energiereichen Adenosintriphosphats hemmt. Und weiterhin: OTTO KANDLER hat vor kurzem gefunden, daß in Chlorella anorganisches Phosphat frei wird, wenn man belichtet; und daß das frei gewordene Phosphat wieder organisch gebunden wird, wenn man verdunkelt. Es ist also möglich, wenn auch keineswegs bewiesen, daß Adenosintriphosphat — im Muskel die Quelle der Muskelkraft — auch im Mechanismus der Photosynthese eine Rolle spielt.

7. Differentialgleichung

Der wesentliche Inhalt dieses Vortrags kann in eine Differentialgleichung zusammengefaßt werden, in der die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung als Funktion der Belichtungszeit t dargestellt wird.

Es sei:

x = der im Licht entwickelte Sauerstoff (cmm)
ε = der zurückreagierende Bruchteil von x
t = die Belichtungszeit (Minuten)

$\mathfrak{J}$ = die absorbierte Quantenintensität (cmm Quanten/Minuten)

φ = die photochemische Ausbeute $\left[\frac{O_2}{h \cdot \nu}\right]$

k = die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (1/Minuten).

Dann ist

$$\frac{dx}{dt} = \mathfrak{J} \cdot \varphi - \varepsilon \cdot \mathfrak{J} \cdot \varphi \left(1 - e^{-kt}\right) \tag{1}$$

mit den Grenzbedingungen

$$t = 0; \ \frac{dx}{dt} = \mathfrak{J} \cdot \varphi; \quad t_{\text{groß}} \ \frac{dx}{dt} = \mathfrak{J} \cdot \varphi \cdot (1 - \varepsilon)$$

und Gleichung (1) integriert

$$x = \mathfrak{J} \cdot \varphi \cdot t \cdot (1 - \varepsilon) + \frac{\varepsilon \cdot \mathfrak{J} \cdot \varphi}{k} \left(1 - e^{-k \cdot t}\right) \tag{2}$$

mit den Grenzbedingungen

$$t = 0, x = 0; \quad t_{\text{groß}} \ x = \mathfrak{J} \cdot \varphi \cdot t \cdot (1 - \varepsilon) + \frac{\varepsilon \cdot \mathfrak{J} \cdot \varphi}{k}.$$

Bei nicht zu hohen Lichtintensitäten aber ist $\varphi = 1$ und dann ist der zur Belichtungszeit t entwickelte Sauerstoff x

$$x = \mathfrak{J} \cdot t \cdot (1 - \varepsilon) + \frac{\varepsilon \cdot \mathfrak{J}}{k} \left(1 - e^{-k \cdot t}\right).$$

Literatur

1 Burk, D., und Warburg, O., Z. Naturf. 6b (1951), 12; Warburg, O., und Geleick, H., Z. Naturf. 6b (1951), 134.
2 Lundsgaard, E., Bioch. Z. 233 (1931), 322.

12a Weitere Steigerung des Energiegewinns im Kreisprozeß der Photosynthese*

Von Otto Warburg, Horst Geleick und Klaus Briese

Die nahezu theoretische Energieausbeute bei der Photosynthese wird erreicht. Sie wird gemessen sowohl in saurem Medium mit der 2-Gefäßmethode, als auch in alkalischem Medium mit der 1-Gefäßmethode.

Durch geringfügige Änderungen der kürzlich beschriebenen Versuchsanordnung[1] konnte die Energieausbeute bei der Photosynthese weiter, über 77%, gesteigert werden.

Zunächst ergab eine Prüfung verschiedener CO_2-Drucke, daß die Energieausbeute bei einem CO_2-Druck von 5% einer Atmosphäre bei 20° ein ausgeprägtes Maximum hat. Der CO_2-Druck von 9%, der in der vorhergehenden Arbeit angewendet wurde, war also durch 5% zu ersetzen.

Ferner ergab eine Prüfung verschiedener Salze, daß höhere osmotische Drucke die Ausbeute vermindern und daß es zweckmäßig ist, die Zellen in destilliertem Wasser zu zentrifugieren oder sogar die Energieausbeute in dest. Wasser zu messen. 10stündige Versuche in dest. Wasser gaben hohe und zeitlich konstante Ausbeuten; niedrigere Ausbeuten zu Beginn von Versuchen, wie wir sie früher beobachtet hatten, wurden unter den veränderten Bedingungen nicht mehr gefunden.

Günstigere Wirkungen des dest. Wassers haben wir schon früher bei der Untersuchung der Lebergranula[2] und der Chloroplastengranula[3] beobachtet. *Chlorella* liegt beim Zentrifugieren in dest. Wasser loser als beim Zentrifugieren in Salzlösungen, und da man weiß, daß man die photosynthetische Wirksamkeit der *Chlorella* durch scharfes Zentrifugieren zum Verschwinden bringen kann, so spielt vielleicht die Möglichkeit, schonender zu zentrifugieren, hier eine Rolle. Doch hat wahrscheinlich die Verminderung des osmotischen Drucks auch sonst günstige Wirkungen auf den Stoffwechsel von Zellen und Formelementen.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 6b (1951): 285.

Zusatz 1961. Dies war die erste Arbeit, in der gezeigt wurde, daß die schlechten Quantenausbeuten, die Emerson für Chlorella in unserm Carbonatgemisch 9 fand, von dem niedrigen CO_2-Druck herrührten, der nur 20 mm Brodie beträgt. Die räumliche Trennung der Carbonatgemische von der Chlorella in den neuen Manometriegefäßen im Jahr 1960 hat dann die Ergebnisse unserer Arbeit von 1951 in jeder Hinsicht bestätigt. Es bleibt das Problem, warum Franck, Gaffron, Rabinowitsch und eine Schar ihrer Schüler ohne jeden Grund annahmen, daß Chlorella, die bei einem CO_2-Druck von 500 mm Brodie gezüchtet ist, bei 20 mm Brodie die maximale Quantenausbeute gibt.

Ein Nachteil dieser Arbeit ist die Vorbehandlung der Zellen mit destilliertem Wasser; ferner, daß die Zellen *in* den m/5 Carbonat-Bicarbonatgemischen suspendiert wurden, die, wie sich später herausstellte, manche Zuchten schnell schädigen; und allgemein, daß die Zellen 1951 noch in Salzlösungen gezüchtet wurden, die mit Quellwasser hergestellt waren, so daß die Zuchten noch keine konstanten Eigenschaften besaßen.

Andere früher beschriebene methodische Verbesserungen waren die Teilung des Lichtstrahls, die Verminderung der Zelldichte, die Vorkompensation der Zellatmung sowie der intermittierende Zusatz des Meßlichts. Wurden nun die alten und die neuen Verbesserungen vereinigt, so stieg die Energieausbeute bei der Photosynthese der *Chlorella* bis in die Nähe der thermodynamisch möglichen Grenze, der „theoretischen" Ausbeute. Während der theoretische Quantenbedarf 2,7 ist, fanden wir 2,8 bis 2,9 — das Ende eines Weges, das seit einigen Jahren vorauszusehen war[1], das zu erreichen aber viel Arbeit kostete.

Die hohe Energieausbeute wurde zuerst in sauren Medien mit der 2-Gefäßmethode gemessen, später aber mit einer Methode bestätigt, die durch ihre Einfachheit ausgezeichnet ist: durch die 1-Gefäßmethode in alkalischer Bicarbonat-Carbonat-Lösung, die den Kohlensäuredruck konstant hält und deshalb bei der Photosynthese nur Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks anzeigt. Durch geringe Änderungen in der Zusammensetzung der gebräuchlichen Lösung gelang es uns, den CO_2-Druck über der Lösung von 0,2% auf 2% zu erhöhen, ohne dadurch zuviel an Resistenz gegen Änderungen des CO_2-Drucks zu verlieren. In einer solchen modifizierten Bicarbonat-Carbonat-Lösung, deren pH 8,8 war, erhielten wir — mit der einfachsten aller manometrischen Methoden — die gleichen hohen Ausbeuten wie in sauren Medien mit der 2-Gefäßmethode; während in der alten Bicarbonat-Carbonat-Lösung die Energieausbeute nur $^1/_4$ davon betrug. So liefern also nunmehr zwei manometrisch grundverschiedene unabhängige Methoden die gleiche Ausbeute, wenn man nur eine bisher übersehene Bedingung einhält: daß der Kohlensäuredruck der gleiche sein muß.

I. Energieausbeute in saurem Medium

Wir bestimmten die Energieausbeute für Zellen, die mit dest. Wasser gewaschen waren, in Salzlösung mit der 2-Gefäßmethode bei einem CO_2-Druck von etwa 5% einer Atm. und 20°. Die Wellenlängen waren die blaue Hg-Linie 436 mμ, die grüne Hg-Linie 546 mμ und die rote Cd-Linie 644 mμ.

Die Zellmenge betrug etwa 20 mm³ Zellen pro Gefäß, dessen Grundfläche etwa 8 cm² war. Der absorbierte Bruchteil des Lichts betrug im Blau etwa 90%, im Grün etwa 20% und im Rot etwa 63%.

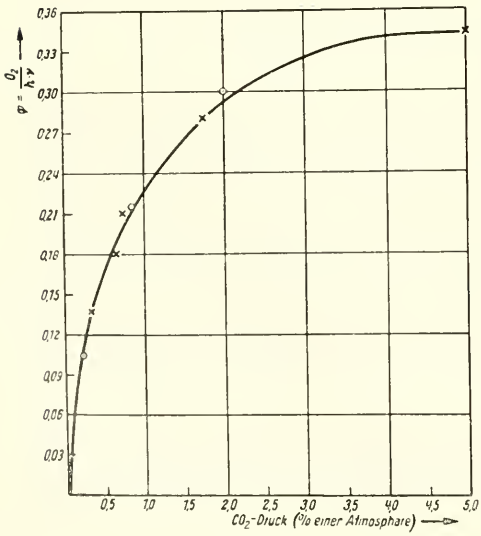


Abb. 1. Quantenausbeute $\varphi = O_2/h\nu$ als Funktion des CO_2-Drucks. × Messungen mit der 2-Gefäßmethode in saurem Medium. ○ Messungen mit der 1-Gefäßmethode in alkalischer Bicarbonat-Carbonat-Lösung bei 20° C.

Will man das Maximum der Energieausbeute erhalten, so darf die absorbierte Lichtintensität nicht zu hoch sein. Sie war bei unseren Versuchen im Blau und Rot etwa 3 mm^3 Quanten pro Minute und im Grün etwa 4 mm^3 Quanten pro Minute. Mehrfach wurde geprüft, daß bei Halbierung der Lichtintensität die Energieausbeute konstant blieb. Die genannten Lichtintensitäten waren, in Anbetracht der guten Ausbeuten, immerhin so hoch, daß pro Stunde etwa das 3fache des Zellvolumens an Sauerstoff entwickelt wurde, oder, wenn die Kompensation der Zellatmung mitgerechnet wird, das 4fache Volumen.

Der Quantenbedarf, den wir fanden, war 3 oder darunter. Als Beispiel sei ein 7stündiger Versuch mit der Wellenlänge 644 mμ mitgeteilt, bei dem die Zellen 5 Stunden mit dem roten Licht intermittierend belichtet wurden (Protokoll 1). Wir fanden:

In der 1. und 2. Stunde	$\gamma = -1{,}22$	$1/\varphi = 2{,}84$
In der 3. und 4. Stunde	$\gamma = -1{,}23$	$1/\varphi = 2{,}92$
In der 5. Stunde	$\gamma = -1{,}22$	$1/\varphi = 2{,}98$
		Mittel *2,91*

Dieser Quantenbedarf entspricht einer Energieausbeute von

$$\frac{112000}{2{,}91 \cdot 44000} 100 = 88\%.$$

Bedenken wir, daß der Quantenbedarf bei der Photosynthese unabhängig von der Wellenlänge ist[5], so können wir den gleichen Quantenbedarf bei der Wellenlänge 675 mμ annehmen, der Wirkungsgrenze im Rot, und würden hier eine Energieausbeute von

$$\frac{112000}{2{,}91 \cdot 42000} 100 = 92\%$$

erhalten. Da $42000 \cdot 2{,}68 = 112000$ ist, so liegt der theoretische Quantenbedarf um 2,7.

II. Einfluß des CO_2-Drucks auf die Energieausbeute in saurem Medium

Wir bestimmten die Energieausbeute bei CO_2-Drucken von 0,3% bis 50% einer Atm. bei 20° in Gemischen von Kohlensäure mit Luft, mit der 2-Gefäßmethode. Die Zellen waren dabei in dest. Wasser suspendiert. pH war 4 bis 5, die Versuchswellenlänge war die rote Cd-Linie 644 mμ. Wir fanden das Maximum der Ausbeute bei 5%, nur 1/3 des Maximums bei 0,3% und nur einen geringen Bruchteil des Maximums bei 50% (Protokolle 2 und 3 und Abb. 1), z. B.:

CO_2-Druck Atm.-%	$\gamma = \frac{CO_2}{O_2}$	$1/\varphi = \frac{h\nu}{O_2}$	$\varphi = \frac{O_2}{h\nu}$
0,33	—1,10	7,30	*0,137*
0,66	—1,10	5,60	*0,179*
0,74	—1,13	4,76	*0,210*
1,75	—1,16	3,60	*0,278*
5,0	—1,14	2,92	*0,342*
26,0	—1,16	4,17	*0,240*

In einer zweiten Versuchsreihe wurde jedes Gasgemisch nur in *einem* Gefäß geprüft und zur Berechnung der Ausbeute der Mittelwert von γ benutzt, der in der ersten Versuchsreihe gefunden worden war (Protokoll 3). Die Anordnung hatte den Vorzug, daß — mit dem geteilten Lichtstrahl — alle 6 Gasgemische an *einem* Tag und an *ein und derselben* Zellsuspension geprüft werden konnten. Das Ergebnis war nahezu dasselbe wie bei der ersten Versuchsreihe, nämlich (bei 20°):

CO_2-Druck Atm.-%	$1/\varphi = \frac{h\nu}{O_2}$	$\varphi = \frac{O_2}{h\nu}$
0,39	8,0	*0,125*
1,71	3,54	*0,282*
5,30	2,85	*0,352*
10,9	3,90	*0,256*
26,2	9,28	*0,108*
50	21,7	*0,046*

Auf eine Nutzanwendung dieser Ergebnisse, die 2-Gefäßmethode betreffend, sei aufmerksam gemacht. Geht man von 5% CO_2 aus, dem Kohlensäuredruck, bei dem die Ausbeute maximal ist, und läßt den Kohlensäuredruck in den beiden Gefäßen durch Photosynthese und Atmung ab- oder zunehmen, immer wird sich der Kohlensäuredruck in dem kleinen Gefäß schneller ändern als in dem großen Gefäß, d. h., in langen Versuchen wird man mit der 2-Gefäßmethode ein falsches und zu schlechtes γ, also eine zu schlechte Ausbeute finden, wenn man nicht durch häufiges Wiedersättigen mit 5% CO_2 den Kohlensäuredruck in den beiden Gefäßen nahezu konstant hält. Dünne Zellsuspensionen und Kompensation der Atmung sind auch aus diesem Grund zu empfehlen.

III. CO_2-Drucke in Bicarbonat-Carbonat-Gemischen

Bicarbonat zerfällt in wäßriger Lösung nach der Gleichung

$$2\,NaHCO_3 \rightleftarrows Na_2CO_3 + H_2O + CO_2 \tag{1}$$

bis zu dem Gleichgewicht

$$\frac{[NaHCO_3]^2}{[Na_2CO_2]\,[CO_2]} = K. \tag{2}$$

wo die Gleichgewichtskonstante K von der Salzkonzentration und der Temperatur abhängt. Bei 20° ist[5] K etwa = 5850 in $^1/_{10}$-*mol.* Salzlösung und = 5310 in $^1/_5$-*mol.* Salzlösung. Berechnet man mit diesen K-Werten den CO_2-Druck, der mit verschiedenen Bicarbonat-Carbonat-Gemischen im Gleichgewicht ist, so findet man:

Gemisch Bicarbonat	Gemisch Carbonat	$^1/_{10}$-*mol.* Salzlösung CO_2-Druck (Atm.-%)	$^1/_5$-*mol.* Salzlösung CO_2-Druck (Atm.-%)
75	25	0,1	0,22
85	15	0,2	0,46
90	10	0,36	0,79
95	5	0,79	1,80

Man sieht aus dieser Zusammenstellung, daß der CO_2-Druck über einem $^1/_5$-*mol.* 95/5-Salzgemisch erheblich ist. Würde man die Salzkonzentration noch

weiter erhöhen, so würde man noch höhere CO_2-Drucke über den Gemischen erhalten; doch ist $^1/_5$-*mol.* die Grenze, über die man aus osmotischen Gründen nicht hinausgehen darf, wenn *Chlorella* das Versuchsobjekt ist.

Ein hoher CO_2-Druck hat an sich noch keinen methodischen Wert, sondern es muß die Resistenz gegen Verschiebung des CO_2-Drucks hinzukommen. Der Kohlensäuredruck über dem Gemisch muß durch die kohlensauren Salze konstant gehalten werden, wenn, z. B. durch Photosynthese oder Atmung, Kohlensäure verbraucht oder gebildet wird. In dieser Hinsicht ist die Resistenz des 85/15-Gemisches ($^1/_{10}$-*mol.*) allgemein als ausreichend befunden worden, sind doch die meisten Messungen der Photosynthese seit unserer Arbeit[6] von 1919 mit diesem Gemisch ausgeführt worden. Die Resistenz des 95/5-Gemischs bei $^1/_5$-*mol.* Konzentration ist zwar kleiner, aber immer noch ausreichend für Versuche von mehreren Stunden Dauer (vgl. Protokoll 4).

Würde man z. B. in unsern Gefäßen Nr. 46 mit $v_F = 7$ cm³ ein gegebenes x_{O_2} nebeneinander in einem sauren Medium, das den CO_2-Druck nicht konstant hält, und in einem alkalischen Medium, das den CO_2-Druck konstant hält, messen, so würde man im zweiten Fall den 3,0fachen manometrischen Ausschlag H erhalten müssen. Tatsächlich ist dies sehr nahe der Fall, wenn man — bei gleichen CO_2-Drucken — die Photosynthese in Wasser und in dem 95/5-Gemisch ($^1/_5$-*mol.*) vergleicht.

Wenn nun die Resistenz des 95/5-Gemischs ($^1/_5$-*mol.*) ausreicht, so reicht die Resistenz der beiden andern angeführten $^1/_5$-*mol.* Gemische erst recht aus, da die beiden andern Gemische im gleichen Volumen die 2fache und die 5fache Menge Carbonat enthalten.

Bei der Herstellung der Gemische ist zu beachten, daß Bicarbonatlösungen immer Carbonat und Carbonatlösungen immer Bicarbonat enthalten, daß also die Zahlen 95/5 usw. nur das ungefähre Verhältnis der Komponenten angeben. Genau definiert dagegen sind die Gemische, wenn man $^1/_5$-*mol.* Salzlösungen im Thermo-

Belichtung	Nr. 46 mm beobachtet		Nr. 47 mm beobachtet		$\gamma = \frac{CO_2}{O_2}$	$\frac{1}{\varphi} = \frac{hr}{O_2}$
30′ weiß	—1,0		+1,0			
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}22$ 30′ i	+3,5		+3,0			$= \frac{60 \cdot 3{,}22}{3{,}6 \cdot 19}$
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}22$ 30′ i	+4,0	120′	+3,0	120′	— 1,22	
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}22$ 30′ i	+3,5	$H' + 19$	+3,0	$H + 8{,}0$	$k'_{O_2} = 3{,}6$	$= 2{,}84$
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}22$ 30′ i	+4,0		+3,0			
— — — 30′ weiß	—1,0		+1,0			
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}33$ 30′ i	+4,0		+3,0			$= \frac{60 \cdot 3{,}33}{3{,}7 \cdot 18{,}5}$
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}33$ 30′ i	+3,5	120′	+3,0	120′	— 1,23	
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}33$ 30′ i	+3,5	$H' + 18{,}5$	+3,0	$H + 7{,}5$	$k'_{O_2} = 3{,}7$	$= 2{,}92$
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}33$ 30′ i	+3,5		+2,5			
— — — 30′ weiß	—1,0		+1,0			
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}41$ 30′ i	+4,0	60′	+3,0	60′	— 1,22	$= \frac{30 \cdot 3{,}41}{3{,}6 \cdot 9{,}5}$
+ λ644 $I = 5{,}2$ $I_a = 3{,}41$ 30′ i	+3,5	$H' + 9{,}5$	+3,0	$H + 4{,}0$	$k'_{O_2} = 3{,}6$	$= 2{,}98$
— — — 30′ weiß	—1,0		+1,0			

Tab. 1 (zu Protokoll 1)

staten mit analysierten Gasgemischen bis zur Sättigung durchströmt (wobei man am besten die Zellen schon vorher zugibt). Denn nach Gl. [2] ist durch den Salzgehalt und den CO_2-Druck das Verhältnis Bicarbonat/Carbonat festgelegt.

CO_2-Druck Atm.-%	$\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Min.}}$ eingestrahlt	$\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Min.}}$ absorbiert	t_j Intermitt.-Zeit Min.	H' mm	H mm	$1/\varphi = \frac{h\nu}{O_2}$	$\varphi = \frac{O_2}{h\nu}$
Anfang 0,42 Ende 0,23 Mittel 0,33	5,25	3,42	60′	+ 5,0 γ' — 1,1	+ 2,5 k'_{O_2} = 2,82	7,3	*0,137*
Anfang 0,90 Ende 0,42 Mittel 0,66	5,30	3,50	240′	+ 23 γ' — 1,1	+ 11,5 k'_{O_2} = 2,82	5,6	*0,179*
Anfang 0,90 Ende 0,58 Mittel 0,74	5,25	3,36	120′	+ 14,5 γ' — 1,13	+ 7,0 k'_{O_2} = 2,93	4,76	*0,21*
Anfang 2,00 Ende 1,50 Mittel 1,75	5,25	3,46	90′	+ 14,0 γ' — 1,16	+ 6,5 k'_{O_2} = 3,12	3,6	*0,278*
5,0	5,30	3,65	60′	+ 12,5 γ' — 1,14	+ 6,0 k'_{O_2} = 3,02	2,92	*0,342*
26	5,25	3,30	120′	+ 15,0 γ' — 1,16	+ 7,0 k'_{O_2} = 3,16	4,17	*0,24*

Tab. 2 (zu Protokoll 2)

CO_2-Druck Atm.-%	$\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Min.}}$ eingestrahlt	$\frac{mm^3 \text{ Quanten}}{\text{Min.}}$ absorbiert	t_j Intermitt.-zeit Min.	H' mm	$1/\varphi = \frac{h\nu}{O_2}$	$\varphi = \frac{O_2}{h\nu}$
Anfang 0,562 Ende 0,214 Mittel 0,39	5,03	3,14	60′	+ 4,0	8,0	*0,125*
Anfang 1,91 Ende 1,51 Mittel 1,71	5,03	3,14	60′	+ 9,0	3,54	*0,282*
5,3	5,03	3,10	60′	+ 11,0	2,85	*0,352*
10,9	5,03	3,10	60′	+ 8,0	3,90	*0,256*
26,2	5,03	3,20	60′	+ 3,5	9,28	*0,108*
50	5,03	3,20	60′	+ 1,5	21,7	*0,046*

Tab. 3 (zu Protokoll 3)
22 mm^3 Zellen in v_F = 7 cm^3; φ berechnet mit γ' = —1,13 k'_{O_2} = 2,95. Gefäß Nr. 46

Nr.	$^1/_5$-*mol.* Gemische	$\frac{mm^3\ Quanten}{Min.}$ eingestrahlt	$\frac{mm^3\ Quanten}{Min.}$ absorbiert	Druckänderung beobachtet [mm]	$\frac{1}{q} = \frac{h\nu}{O_2}$	$q = \frac{O_2}{h\nu}$
1	75 Bicarbonat 25 Carbonat CO_2-Druck 0,22% (berechnet)	5,25	3,42	30′ weiß + 2,0 30′ i − 8,0 30′ i − 7,5 30′ i − 7,5 30′ weiß + 2,0 90′ *H* = *+ 17*	$\frac{1}{q} = \frac{45 \cdot 3{,}42}{0{,}911 \cdot 17} = 10$	*0,10*
2	75 Bicarbonat 25 Carbonat CO_2-Druck 0,22% (berechnet)	5,30	3,28	30′ weiß − 2,0 30′ i + 4,0 30′ i + 4,0 30′ i + 4,0 30′ weiß − 2,0 90′ *H* = *− 18*	$\frac{1}{q} = \frac{45 \cdot 3{,}28}{0{,}911 \cdot 18} = 9{,}02$	*0,11*
3	90 Bicarbonat 10 Carbonat CO_2-Druck 0,85%	5,0	3,10	30′ weiß − 1,0 30′ i − 10,0 30′ i + 10,0 30′ weiß − 1,0 60′ *H* = *+ 22*	$\frac{1}{q} = \frac{30 \cdot 3{,}10}{0{,}915 \cdot 22} = 4{,}62$	*0,216*
4	95 Bicarbonat 5 Carbonat CO_2-Druck 1,99%	5,02	3,15	30′ weiß + 2,0 30′ i + 17,5 30′ i + 17,0 30′ weiß + 1,5 60′ *H* = *+ 31*	$\frac{1}{q} = \frac{30 \cdot 3{,}15}{0{,}915 \cdot 31} = 3{,}33$	*0,30*
5	95 Bicarbonat 5 Carbonat CO_2-Druck 1,80% (berechnet)	5,02	3,15	30′ weiß + 1,5 30′ i − 17,0 30′ i + 16,5 30′ weiß + 1,5 60′ *H* = *+ 30,5*	$\frac{1}{q} = \frac{30 \cdot 3{,}15}{0{,}911 \cdot 30{,}5} = 3{,}40$	*0,294*

Tab. 4 (zu Protokoll 5)

IV. Einfluß des CO_2-Drucks auf die Energieausbeute in alkalischem Medium

Wir bestimmten die Energieausbeute bei CO_2-Drucken von 0,22% bis 2% einer Atmosphäre in Bicarbonat-Carbonat-Gemischen, deren pH 8,80 bis 9,48 war. Diese 3 Gemische hielten den CO_2-Druck konstant, und so war nur *ein* Gefäß zur Messung der Ausbeute notwendig und die Ausbeuten konnten mit der einfachen Gefäßkonstante k_{O_2} berechnet werden. Im übrigen waren die Versuchsbedingungen genau die gleichen wie bei der Messung der Ausbeute in saurem Medium. Wir fanden für die Wellenlänge 644 mμ bei 20° (Protokoll 5):

$^1/_5$-*mol.* Salzlösg. Bicarbonat	Carbonat	*p*H	CO_2-Druck (Atm.-%)	$1/q = \frac{h\nu}{O_2}$	$q = \frac{O_2}{h\nu}$
75	25	9,48	0,22	9,50	*0,105*
90	10	9,10	0,85	4,62	*0,216*
95	5	8,80	2,0	3,33	*0,304*

Trägt man die q-Werte, die bei den 3 CO_2-Drucken gemessen wurden, in die Kurve der Abb. 1 ein, so zeigt sich, daß sie, innerhalb der Grenzen der Meßfehler, auf derjenigen Kurve liegen, die mit der 2-Gefäßmethode in saurem Medium gefunden wurde. Die Ausbeute in den 3 Bicarbonat-Carbonat-Gemischen ist also

nicht nur vom CO_2-Druck abhängig, sondern sie wird durch den CO_2-Druck *bestimmt*. Im übrigen ist die Kurve der Abb. 1, mit ihren durch die 2-Gefäßmethode und die 1-Gefäßmethode zusammenfallenden Punkten, ein glänzendes Zeugnis für die 2-Gefäßmethode in der Form, wie sie von uns in den letzten Jahren zur Messung der Ausbeute bei der Photosynthese entwickelt worden ist[7].

Die 2-Gefäßmethode hat vor der 1-Gefäßmethode den unschätzbaren Vorzug, daß sie die wichtigste Substanz der Photosynthese, die Kohlensäure, nicht methodisch eliminiert. Wem aber die 2-Gefäßmethode zu kompliziert ist, der kann nunmehr die maximale Ausbeute an Sauerstoff bei der Photosynthese auch mit 1-Gefäßmethoden bestimmen. Man messe zunächst die Ausbeute in $m/5$-Bicarbonat-Carbonat bei 2% CO_2-Druck. Dann messe man für dieselben Zellen in saurem Medium die Zunahme der manometrischen Lichtwirkung, wenn man den CO_2-Druck von 2% auf 5% erhöht. Da sich γ zwischen 2% und 5% CO_2 nicht ändert, so ist auch für die Bestimmung des Faktors zur Umrechnung der Ausbeute von 2% auf 5% nur eine 1-Gefäßmethode notwendig. Nach der Kurve ist dieser Faktor 1,19. Um also in unserem Beispiel aus dem q-Wert, den wir bei 2% CO_2-Druck in alkalischem Medium gemessen haben, die maximale Ausbeute zu erhalten, müssen wir $q = 0{,}30$ mit 1,19 multiplizieren und erhalten dann:

$$(q)_{\text{Maximum}} = 0{,}30 \cdot 1{,}19 = \mathit{0{,}356},$$

oder

$$(1/q)_{\text{Minimum}} = 0{,}33/1{,}19 = \mathit{2{,}80}.$$

Nunmehr können wir auch die Frage beantworten, warum es Robert Emerson nicht gelang, die maximale Ausbeute bei der Photosynthese zu messen: weil er, 14 Jahre lang, die Ausbeute in unserem alten Bicarbonat-Carbonat-Gemisch gemessen hat, in dem der CO_2-Druck (bei 20°) 0,2% einer Atmosphäre ist. Man entnimmt aber aus der Kurve der Abb. 1, daß bei einem CO_2-Druck von 0,2% die Ausbeute nur etwa $^1/_4$ der maximalen Ausbeute beträgt. Dies ist der Bruchteil, den Emerson fand und den er für die maximale Ausbeute hielt.

Herrn Walter Schröder sprechen wir für seine Hilfe unseren Dank aus.

Protokolle[7]

Chlorella pyrenoidosa wurde nach Vorschrift[8] gezüchtet. Die Aussaat pro Kulturflasche, deren Volumen 250 cm³ war, betrug 30 mm³ Zellen. Nach 48 Stunden, wenn sich die Zellen auf 700 bis 800 mm³ vermehrt hatten, wurden sie zur Messung benutzt. Sie wurden auf der Zentrifuge mit dest. Wasser gewaschen, wobei mit kleiner Tourenzahl so kurz wie möglich zentrifugiert wurde. Die Zellen lagen dann so lose am Boden der breiten Zentrifugiergläser von etwa 20 cm² Grundfläche, daß das Wasser nicht abgegossen werden konnte, sondern vorsichtig abgesaugt werden mußte. Zur Messung blieben die Zellen in dest. Wasser suspendiert, was wir vorzogen oder es wurden Salze hinzugefügt. Die Konzentration der Zellen in den Meßgefäßen war etwa 3 mm³ pro cm³ und nicht größer als in den 48stündigen Kulturen. Die Zellkonzentration war also eine durchaus physiologische.

Die Kohlensäure-Luftgemische wurden im Institut in Stahlflaschen hergestellt und mit einem Haldane-Apparat analysiert.

Die Lichtabsorption wurde mit der actinometrischen Methode gemessen, und zwar immer in demjenigen Medium, in dem die Ausbeute gemessen wurde. Die Lichtabsorption in den Trögen betrug im Blau etwa 90%, im Rot etwa 63% und im Grün etwa 20% des in die Meßgefäße ein-

gestrahlten Lichts. Da im Lauf langer Versuche das Chlorophyll und damit die Lichtabsorption zunahm, wurde die Lichtabsorption am Anfang und am Ende der Versuche gemessen und für die Zwischenzeiten interpoliert. Zum Beispiel nahm die Lichtabsorption für die Wellenlänge 644 mμ in 7 Stunden von 61% auf 66% zu. Die gleichen Ausbeuten bei verschiedenen Wellenlängen, z. B. bei 20% Absorption im Grün und bei 90% Absorption im Blau, sind eine gute Kontrolle unserer Methode der Absorptionsmessung.

Die Lichtquellen waren 200-Watt- oder 500-Watt-Quecksilberhochdrucklampen mit oder ohne Cadmiumzusatz der Osram-Studiengesellschaft in Berlin. Die rote Cd-Linie wurde mit Hilfe einer Interferenzscheibe isoliert, als Filter wurde lediglich ein Wasserfilter von 5 cm Schichtdicke benutzt. Die grüne und die blaue Hg-Linie wurden, wie beschrieben, mit Filtern isoliert. Der Lichtstrahl war immer geteilt, die beiden Teile waren bolometrisch auf gleiche Intensität justiert. Die Intensitäten waren mehr als ausreichend. Näheres darüber findet man in Abschnitt I und in den speziellen Protokollen.

Die Atmung wurde immer nahezu kompensiert, und zwar mit einer 25-Watt-Metallfadenlampe, die vor dem Thermostaten zwischen den beiden Strahlen des Meßlichts angebracht und die so abgeblendet war, daß das Kompensationslicht im wesentlichen durch die Grundflächen der Meßgefäße (nicht durch die Seitenflächen) eindrang.

Ein automatisches Schaltwerk unterbrach den monochromatischen Lichtstrahl — vor seiner Teilung — in Zeitabständen von 1 Minute. Es ist sicher, daß bei langen Versuchen die Ausbeute in sauren Medien in intermittierendem Licht größer als in kontinuierlichem Licht ist. In alkalischen Medien dagegen ist es wahrscheinlich gleichgültig, ob das Meßlicht kontinuierlich oder intermittierend zugesetzt wird. In einer folgenden Arbeit wird Näheres darüber mitgeteilt werden.

Protokoll 1 (Tab. 1): Energieausbeute in saurem Medium

λ 644 mμ. 20° C. 5,3 Vol.-% CO_2 im Gasraum. 2 Kästchen.

Gefäß Nr. 46: $v = 16{,}59$; $v_F = 7{,}00$ cm³; $k'_{O_2} = 0{,}915$; $k'_{CO_2} = 1{,}503$ mm².
Gefäß Nr. 47: $v = 20{,}93$; $v_F = 7{,}00$ cm³; $k_{O_2} = 1{,}321$; $k_{CO_2} = 1{,}910$ mm².

Zellen mit dest. Wasser gewaschen. In jedes Gefäß 6 cm³ Zellsuspension in dest. Wasser mit 20 mm³ Zellen + 0,3 cm³ dest. Wasser + 0,7 cm³ Salzlösung (10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl und 0,3 g NH_4Cl, mit Wasser auf 200 cm³). Grundfläche der Kästchen etwa 8 cm².

Zellatmung mit weißem Licht nahezu kompensiert. Meßlicht 644 mμ intermittierend hinzugefügt (1 Min. weiß, 1 Min. weiß + rot). Absorption am Anfang des Versuchs 61%, am Ende 65,6%. In Tab. 1 bedeutet „i" intermittierend in 1 Minute, I die einfallende und I_a die absorbierte Lichtintensität in mm³ Quanten pro Min.

Protokoll 2 (Tab. 2): Einfluß des CO_2-Drucks auf die Energieausbeute in saurem Medium

Wellenlänge, Gefäße, Temperatur, Kompensation der Atmung und allgemeine Anordnung wie in dem Versuch des Protokolls 1.

Die Zellen wurden in dest. Wasser gewaschen und zur Messung in dest. Wasser suspendiert. Je 7 cm³ Suspension, mit je 21 bis 22 mm³ Zellen, wurden mit dem zu prüfenden Gasgemisch 30 Min. im Thermostaten geschüttelt, wobei das Gasgemisch dauernd durch den Gasraum strömte.

War der CO_2-Druck niedrig, so wurde in der Versuchszeit ein erheblicher Teil der Kohlensäure verbraucht, und als CO_2-Druck war das Mittel von Anfangs- und Enddruck einzusetzen. Wir bildeten das Mittel für das kleine Gefäß. Man beachte, daß der CO_2-Druck in dem größeren Gefäß weniger abnimmt, was einen Fehler in γ bedingt, der aber in den Versuchen der Tabelle unwesentlich ist. Der Fehler liegt in der Richtung, daß er die Ausbeute φ verschlechtert.

Die folgende Versuchsreihe wurde an aufeinanderfolgenden Tagen mit Zellen 48stündiger Kulturen, also nicht mit Zellen der gleichen Suspension ausgeführt, während natürlich für jedes Gefäßpaar der 2-Gefäßmethode immer die gleiche Suspension benutzt wurde. „i" in Tab. 2 bedeutet intermittierend in 1-Minuten-Perioden.

Protokoll 3 (Tab. 3): Einfluß des CO_2-Drucks auf die Energieausbeute in saurem Medium

Der Versuch unterscheidet sich von dem Versuch des Protokolls 2 nur dadurch, daß der Einfluß der verschiedenen CO_2-Drucke auf ein und dieselbe Zellsuspension, an *einem Tage*, gemessen wurde. Die Zeit reichte dann nicht für die 2-Gefäßmethode aus, sondern es wurde für jedes Gas-

gemisch nur *ein* Gefäß verwendet, und die Ausbeute mit dem Mittelwert von γ, der in dem Versuch des Protokolls 1 gefunden war, berechnet. Nahezu dieselben Ausbeuten wie in dem Versuch des Protokolls 2 wurden für gleiche CO_2-Drucke erhalten.

Protokoll 4: Retentionsbestimmung für das Bicarbonat-Carbonat-Gemisch $^1/_5$*-mol.* 95/5

2 Manometergefäße mit doppelter Birne. 20° C

	Gefäß Nr. 40	Gefäß Nr. 42
	$v = 22{,}87$ cm³	$v = 21{,}94$ cm³
	$k_{CO_2} = 2{,}10$ mm²	$k_{CO_2} = 2{,}01$ mm²
Hauptraum	7 cm³ Wasser	7 cm³ $^1/_5$-mol. 95/5-Gemisch
Gasraum	1,91 Vol.-% CO_2-Luft	1,91 Vol.-% CO_2-Luft
Birnen	a) 0,2 cm³ n-H_2SO_4 b) 0,2 cm³ $n/50$-$NaHCO_3$	a) 0,2 cm³ n-H_2SO_4 b) 0,2 cm³ $n/50$-$NaHCO_4$

Nach Einkippen der H_2SO_4 in das $NaHCO_3$

Endwert	+ 40,5 mm = 85 mm³	+ 3,0 mm = 6,03 mm³

Also retiniert
85 — 6,0 = 79 mm³

Retiniert pro mm

$$\frac{79}{3} = \frac{26{,}4 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2.}{\text{mm}}$$

Protokoll 5 (Tab. 4): Einfluß des CO_2-Drucks auf die Energieausbeute in alkalischem Medium

Die Zellen wurden zweimal in dest. Wasser gewaschen und dann in die verschiedenen Bicarbonat-Carbonat-Gemische gebracht. 21 bis 22 mm³ Zellen pro Gefäß, Absorption des Meßlichts 61 bis 65% der einfallenden Intensität. Atmung durch weißes Licht nahezu kompensiert. Meßlicht 644 mμ, das intermittierend in 1-Minute-Perioden zu dem weißen Licht hinzugefügt wurde (1′ weiß, 1′ weiß + rot usw.) 20° C.

Gefäß Nr. 46: $v = 16{,}59$; $v_F = 7{,}00$ cm³; $k_{O_2} = 0{,}915$ mm².
Gefäß Nr. 47: $v = 16{,}56$; $v_F = 7{,}00$ cm³; $k_{O_2} = 0{,}911$ mm².

In den Versuchen 1, 2 und 5 wurde in den Gasraum Luft eingefüllt und der sich einstellende CO_2-Druck nach Gleichung (2) Abschnitt III berechnet. In den Versuchen 3 und 4 wurden in den Gasraum analysierte Gasgemische eingeleitet und die Flüssigkeiten damit gesättigt.

Literatur

1 Warburg, O., und Geleick, H., Z. Naturforschg. 6b (1951), 134.
2 Warburg, O., Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 154 (1913), 599; 158 (1914), 19, 189.
3 Warburg, O., Schwermetalle, 2. Aufl., Berlin 1948, S. 170.
4 "That in a perfect nature photosynthesis is perfect too". Warburg, C. O., und Burk, D., Arch. Biochem. 25 (1950), 410.
5 Warburg, O., und Negelein, E., Z. physik. Chem. 106 (1923), 191.
6 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.
7 Warburg, O., Burk, D., und Schade, A., Extensions of Photosynthetic Experimentation. Symposion Vol. V, Soc. for Experimental Biology 1951; Burk, D., und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12; Warburg O., und Geleick[1], H.
8 Die Entwicklung der 2-Gefäß-Methode zu der heutigen Form findet man beschrieben in Warburg O. und Burk, D. Arch. Biochem. 25 (1950), 410, sowie bei Burk D. und Warburg[7] O. und Warburg O. und Geleick[1] H.

13 Cytohämin aus Herzmuskel*

Von Otto Warburg und Hans-Siegfried Gewitz

Cytohämin, dessen Isolierung Warburg und Negelein[1] versucht haben, zeigt in wäßrigem Pyridin die Hämochromogenreaktion 587 gegenüber 557 des Bluthämins. Wir haben eine Methode ausgearbeitet, um Cytohämin in größeren Mengen aus Pferdeherzen zu gewinnen und haben es aus salzsaurem Aceton kristallisiert (Abb. 1). Für die Chlorferriverbindungen des Cytohämins und des Bluthämins fanden wir[2]:

	C	H	N	Fe	Cl	O
Cytohämin %	64,47	6,79	6,50	6,42	4,20	11,62
Bluthämin %	62,63	4,94	8,59	8,56	5,43	9,81

Abb. 1. Cytohämin aus Herzmuskel des Pferdes.

Cytohämin enthält also mehr Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff als Bluthämin, aber weniger Eisen und Stickstoff. Seiner Zusammensetzung nach steht es zwischen Bluthämin und den Häminen, die man sich entstanden denken kann aus Chlorophyll b durch Ersatz des Magnesiums durch Eisen und Oxydation der überzähligen Wasserstoffatome. Wie das Eisensalz des Phäophytins, ist Cytohämin in Äther und in Tetrachlorkohlenstoff löslich.

Wie Bluthämin, enthält Cytohämin zwei Carboxylgruppen, die bei pH 7,5 Kohlensäure aus Bikarbonat austreiben (Protokoll 1).

Anders als Bluthämin enthält Cytohämin nur eine Vinylgruppe, die durch Hydrierung mit Platin und Wasserstoff in alkalischer Lösung nachgeweisen werden kann (Protokoll 2).

Wie das Eisensalz des Phäophytins verbraucht das Cytohämin bei der Hydrierung mit Platin und Wasserstoff in Eisessig $6^1/_2$ Mol. H_2, während Bluthämin

---

* Aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 288 (1951): 1.

nur $5^1/_2$ Mol. H_2 verbraucht. Subtrahiert man den für die Reduktion des Eisens und für die Hydrierung der Vinylgruppen verbrauchten H_2 von dem insgesamt verbrauchten H_2, so bleibt für Cytohämin und Phäophytin-Eisen ein H_2-Verbrauch von 5 Mol., für Bluthämin ein Verbrauch von nur 3 Mol. übrig (Protokoll 3).

Wie Phäohämin und Spirographishämin, so verwandelt sich auch Cytohämin unter den verschiedensten Bedingungen in ein kurzwelliges Hämin. Die Umlagerung des Phäohämins und des Spirographis-Hämins ist 1931 entdeckt worden[3]; HANS FISCHER[4] versuchte sie durch Anlagerungen an eine Formylgruppe zu erklären. Cytohämin zeigt diese Umwandlung sogar, wenn man die wäßrige Pyridinlösung mit Hydrosulfit reduziert. *Keine* Umwandlung fanden wir, wenn wir das Eisen (in wäßriger Pyridinlösung) mit Platin und Wasserstoff reduzierten, wobei jedoch darauf zu achten ist, daß bei längerer Einwirkung von Platin und Wasserstoff nicht nur das Eisen der Hämine reduziert wird (vgl. oben).

Schließlich sei noch hervorgehoben, daß Cytohämin kein Phytolester ist, woran früher vermutungsweise gedacht worden war[1].

Protokolle

1. Analysen

3,54, 3,69, 3,92 mg Sbst.: 8,31, 8,73, 9,28 mg CO_2, 2,15, 2,24, 2,38 mg H_2O. — 4,69, 4,91, 4,48 mg Sbst.: 0,268, 0,282, 0,255 ccm N (23^0, 746,5 mm, 23^0, 746,5 mm, 22^0, 746,6 mm). — 4,55, 5,22 mg Sbst. gaben 0,77, 0,89 mg AgCl. — 0,66, 1,08 mg Sbst. zeigten kolorimetrisch mit *o*-Phenanthrolin 0,0425, 0,069 mg Fe an.

C	64,06	64,56	64,60	Mittelwert	64,47%
H	6,80	6,79	6,79	Mittelwert	6,79%
N	6,53	6,51	6,48	Mittelwert	6,50%
Cl	4,19	4,22		Mittelwert	4,20%
Fe	6,45	6,38		Mittelwert	6,42%

Kein P, kein S, kein Methoxyl. O_2 durch Differenz: 11,62%.

Manometrische Bestimmung der Carboxylgruppen bei 20^0

	I	II	III
Hauptraum	kein Hämin	0,68 mg Chlorferricytohämin gelöst in 0,1 ccm $\sim\frac{n}{10}$ — NaOH = 0,78 Mikromole	0,74 mg Chlorferribluthämin gelöst in 0,1 ccm $\sim\frac{n}{10}$ — NaOH = 1,14 Mikromole
	0,1 ccm $\sim\frac{10}{n}$ NaOH	(Mol.-Gew = 873)	(Mol.-Gew. = 651,8)
	1,9 ccm H_2O	1,9 ccm H_2O	1,9 ccm H_2O
Birne	0,2 ccm $n/10$-H_2SO_4	0,2 ccm $n/10$-H_2SO_4	0,2 ccm $n/10$-H_2SO_4
Gasraum	1% CO_2 in Luft	1% CO_2 in Luft	1% CO_2 in Luft
Nach Einkippen der H_2SO_4	256 cmm CO_2	218 cmm CO_2	208 cmm CO_2
		I—II = 38 cmm CO_2 = 1,7 Mikromole CO_2	I—III = 48 cmm CO_2 = 2,14 Mikromole CO_2
		$\frac{\text{Carboxyl}}{\text{Hämin}} = \frac{1,7}{0,78} = 2,18$	$\frac{\text{Carboxyl}}{\text{Hämin}} = \frac{2,14}{1,14} = 1,88$

2. *Hydrierung in Borat bei 20°*

Hauptraum:	10 mg Platinschwarz 2 ccm *m*/5-Boratpuffer p_H 11,04	10 mg Platinschwarz 2 ccm *m*/5-Boratpuffer p_H 11,04
Birne:	1,35 mg Chlorferri-Bluthämin, gelöst in 0,05 ccm *n*/10-NaOH = 2,07 Mikromole (Mol.-Gew. 651,8) 0,15 ccm H_2O	1,23 mg Chlorferri-cytohämin, gelöst in 0,05 ccm *n*/10-NaOH = 1,41 Mikromole (Mol.-Gew. 873) 0,15 ccm H_2O
Gasraum:	H_2	H_2
nach Min.	cmm H_2 aufgenommen	cmm H_2 aufgenommen
50	59,0	26,4
120	99,5	40,0
200	112,0	46,5
240	113,5	49,5
280	115,0	51,0
	Endwert 115,0 cmm = 2,48 Mole H_2 pro Mol Hämin	Endwert 51,0 cmm = 1,62 Mole H_2 pro Mol Hämin

wobei 1/2 Mol *W*asserstoff für die Reduktion des Ferri-Eisens verbraucht wird.

3. *Hydrierung in Eisessig bei 20°*

Hauptraum:	20 mg Platinschwarz 2 ccm Eisessig	20 mg Platinschwarz 2 ccm Eisessig	20 mg Platinschwarz 2 ccm Eisessig
Birne:	1,25 mg Protoporphyrin, gelöst in 0,2 ccm Eisessig = 2,22 Mikromole (Mol-.Gew. = 562)	1,12 mg Chlorferri-verbindung von Phäophytin a + b, gelöst in 0,2 ccm Eisessig = 1,16 Mikromole (Mol.-Gew. = 965)	1,22 mg Chlorferri-cytohämin, gelöst in 0,2 ccm Eisessig = 1,4 Mikromole (Mol.-Gew. = 873)
Gasraum:	H_2	H_2	H_2
nach Min.	cmm H_2 aufgenommen	cmm H_2 aufgenommen	cmm H_2 aufgenommen
40	121,0	123,5	136,0
120	167,2	145,9	164,2
240	179,3	160,0	181,5
360	217,5	166,5	190,5
720	257,0	174,9	202,0
1080	262,5	176,3	208,0
	Endwert 262,5 cmm = 5,27 Mole H_2 pro Mol Protoporphyrin	Endwert 176,3 cmm = 6,79 Mole H_2 pro Mol Phäophytin a + b-Hämin	Endwert 208,0 cmm = 6,65 Mole H_2 pro Mol Cytohämin

Literatur

1 Warburg, Otto, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Verlag Saenger, 2. Aufl., Berlin 1948. E. Negelein, Biochem. Z. 266, 412 (1933).

2 Die Analysen hat A. Lehmann ausgeführt.

3 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 235 (1931), 240; O. Warburg und E. Negelein, Biochem. Z. 244 (1931), 9.

4 Fischer, Hans, und Seemann, C. v., diese Z. 242 (1936), 133.

14 Cyto-Deutero-Porphyrin*

Von Otto Warburg und Hans-Siegfried Gewitz

Kristallisiertes Cytohämin[1] wurde auf Rat von Professor Karl Zeile mit Resorcin zur Deuteroverbindung abgebaut. Die Kohlenwasserstoffkette, die den niedrigen Eisengehalt des Cytohämins bedingt (6,4% gegen 8,6% des Bluthämins), wurde dabei entfernt und es entstand in guter Ausbeute das schön kristallisierende Cyto-Deutero-Porphyrin (Abb. 1). Elementare Zusammensetzung, Absorptionsbanden

Abb. 1. Cyto-Deutero-Porphyrin.

und Salzsäurezahl von Cyto-Deutero- und Proto-Deuteroporphyrin stimmen sehr nahe überein. Indessen zeigt ein Vergleich der Schmelzpunkte der Methylester, daß die beiden Porphyrine nicht identisch sind. Mit Methanol-Salzsäure entsteht aus Cyto-Deutero-Porphyrin mit einer Ausbeute von 79% ein Dimethylester (Abb. 2), der bei 189° schmilzt, während der entsprechende Proto-Deuteroester[2] bei 219° schmilzt.

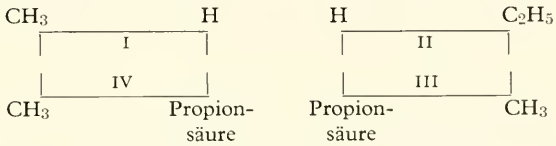
* Aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 292 (1953): 174.

Von andern Abbauversuchen erwähnen wir den Abbau des Cytohämins mit Chromsäure nach der Methode von KÜSTER. Wir erhielten keine Imidfraktion, aber mehr als 1 Mol. Hämatinsäure.

Auf Grund der bisher vorliegenden Tatsachen vermuten wir, daß die für das Cytohämin charakteristische Kohlenwasserstoffkette sich in Ring I oder II be-

Abb. 2. Dimethylester des Cyto-Deutero-Porphyrins.

findet. Für Cyto-Deutero-Porphyrin möchten wir die folgende Formel zur Diskussion stellen:*



Herrn *Arnold Lehmann* danken wir für die Ausführung der Elementar-Analysen.

1. Cyto-Deutero-Porphyrin

100 mg der kristallisierten *Chlorferriverbindung des Cytohämins* wurden mit 1 g *Resorcin* (aus Benzol umkristallisiert) 15 Min. bei etwa 190° im Paraffinbad erhitzt. Die noch flüssige Schmelze wurde mit 1 *l* Wasser 24 Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Die ausgefallenen Flocken, die das gesuchte Porphyrin enthielten, wurden auf dem Filter mit heißem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine gelbgrüne Fluoreszenz mehr zeigte, wozu etwa 2 *l* Wasser nötig waren. Die gewaschenen Flocken wurden mit 20 ccm *n*/10-NaOH vom Filter gelöst, mit *n*/10-Essigsäure wieder ausgefällt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute an diesem Rohprodukt 102 mg.

Das Rohprodukt — ein Gemisch von Hämin und Porphyrin — wurde in 30 ccm Eisessig suspendiert. Unter Durchleitung von CO_2 auf dem siedenden Wasserbad wurden 5 ccm einer frisch be-

* Diese Formel berücksichtigt noch nicht die später gefundene Tatsache des Tribrom-Derivats, Beitrag 15. Richtige Formel vergl. Einleitung.

reiteten Ferroacetat-Eisessig-Lösung sowie 2 ccm konz. Salzsäure zugegeben. Nach etwa 7 Min. war die Substanz gelöst und alles Eisen abgespalten. Die unter Kohlensäuredurchleitung gekühlte Lösung wurde in 1 *l* Wasser gegossen; das Porphyrin wurde durch Abstumpfen der Säure ausgefällt die ausgefallenen Flocken wurden auf einem Faltenfilter gesammelt und mit verd. Essigsäure und Wasser gewaschen.

Der Niederschlag wurde mit 40 ccm *n*/50-NaOH vom Filter gelöst und mit 5 ccm *n*/5-Essigsäure wieder ausgefällt, abzentrifugiert und mit Wasser neutral gewaschen. Dann wurde zweimal mit je 10 ccm 0,1-proz. Salzsäure extrahiert, um Verunreinigungen zu entfernen, und weiterhin mit 1,5-proz. Salzsäure, wobei das Porphyrin in Lösung ging. Die Lösung des extrahierten Porphyrins betrug 200 ccm; sie wurde mit Wasser auf 5 *l* verdünnt und mit peroxydfreiem Äther im *Neumann*schen Apparat extrahiert. In der Vorlage kristallisierte das Porphyrin aus dem Äther aus. Es wurde mit Äther gewaschen und getrocknet. Zum Umkristallisieren wurde in wenig Pyridin gelöst, filtriert, das Pyridin durch Luftdurchblasen auf dem Wasserbad bei 60° auf 0,1 ccm eingeengt und mit 2 ccm Äther versetzt, worauf das Porphyrin auskristallisierte. Ausbeute an diesem umkristallisierten Produkt 22,5 mg (nach obiger Formel etwa 40% d. Th.).

Abb. 3. Hämin des Cyto-Deutero-Porphyrins.

Zur Analyse wurde 3 Stdn. im Hochvakuum bei 60° getrocknet. 3,23 mg Sbst., 8,26 mg CO_2, 1,69 mg H_2O. — 2,82 mg Sbst. 0,285 ccm N (22°, 737 mm Hg).

Proto-Deutero-Porphyrin (Mol.-Gew. 510,56). Ber. C 70,56, H 5,93, N 10,98.
Gef. C 69,80, H 5,86, N 11,34.

Das Absorptionsspektrum des Cyto-Deutero-Porphyrins in Pyridin-Äther ist von dem Spektrum des Proto-Deutero-Porphyrins kaum zu unterscheiden. Vielleicht sind die Banden der Cytoverbindung etwas kurzwelliger.

Die Salzsäurezahl der Cytoverbindung ist 0,4 bis 0,5 und stimmt mit der Protoverbindung überein.

Auch im Verhalten der beiden Porphyrine zu andern Lösungsmitteln haben wir keine Unterschiede gefunden.

2. Dimethylester des Cyto-Deutero-Porphyrins

17 mg *Cyto-Deutero-Porphyrin* wurden in 7 ccm Methanol suspendiert und bei 0° mit trocknem HCl gesättigt. Nach 3stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde die Lösung unter vermindertem Druck bei 35° zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 10 ccm Chloroform gelöst und mit

wasserfreiem Natriumcarbonat geschüttelt, bis das vierbandige Porphyrinspektrum erschien. Die filtrierte Lösung wurde auf 0,2 ccm eingeengt und mit 2 ccm Äther versetzt, wobei der Ester auskristallisierte. Ausb. 13,5 mg. Zur Methoxylbestimmung und Schmelzpunktbestimmung wurde der Ester mehrfach aus Chloroform-Äther umkristallisiert.

Methoxyl: 2,36, 2,13 mg Sbst., 3 Stdn. im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet, verbr. 2,49. 2,27 ccm $n/50$-Thiosulfat. Für Proto-Deutero-Porphyrin-Dimethylester ber. CH_3O 11,52, gef. 10,91, 11,02.

3. Hämin des Cyto-Deutero-Porphyrins

1 mg kristall. *Cyto-Deutero-Porphyrin* wurde in 0,1 ccm Eisessig-Kochsalz suspendiert. Unter Durchleiten von Kohlensäure wurden 0,3 ccm einer frischbereiteten *Ferroacetat-Eisessig*-Kochsalzlösung zugesetzt und 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Verdampfter Eisessig wurde ersetzt. Dann wurde der CO_2-Strom unterbrochen und langsam abgekühlt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei 5^0 war das Chlorhämin auskristallisiert (Abb. 3). Es wurde auf der Zentrifuge mit Essigsäure und dann mit Wasser gewaschen.

In 30-vol.-proz. Pyridin-Wasser gelöst und mit Hydrosulfit versetzt erschien eine Hämochromogenbande bei 545 mμ, das ist die Lage der entsprechenden Bande[3] des Proto-Deuterohämins. Vielleicht ist die Bande der Cytoverbindung ein wenig kurzwelliger als die Bande der Protoverbindung.

Zusammenfassung

Der Abbau des Cytohämins zur Cyto-Deutero-Verbindung wird beschrieben.

Literatur

1 Warburg, O., und Gewitz, H.-S., diese Z. 288(1951), 1.
2 Fischer, H., Pyrrolbuch, II, 1, S. 416.
3 l. c. 2, S. 415.

15 Über Gewinnung und Abbau des Cytohämins*

Von Otto Warburg, Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

Wir beschreiben im Folgenden die Gewinnung und Kristallisation des Cytohämins[1] aus Pferdeherzen; seine Hydrierung mit Platin und Wasserstoff; seinen Abbau bei der Resorcinschmelze[2] zu Cyto-deutero-porphyrin sowie den Abbau des Cyto-deutero-porphyrins mit Chromsäure, wobei Hämatinsäure und Methylmaleinimid entstehen.

Nach Spektrum und Elementaranalyse war Cyto-deutero-porphyrin von Proto-deutero-porphyrin nicht zu unterscheiden. Aus den Schmelzpunkten der Dimethylester jedoch ging hervor, daß die beiden Porphyrine verschieden sind.

Dieses Ergebnis ist inzwischen dadurch bestätigt worden, daß das Cyto-deutero-porphyrin bei der Bromierung 3 Atome Brom aufnimmt, während Proto-deutero-porphyrin nur 2 Atome Brom aufnimmt. Cyto-deutero-porphyrin scheint also 3 freie β-Stellungen zu enthalten, was K. Zeile auf Grund unsrer Analysen (private Mitteilung) bereits 1953 vermutet hatte. Herr Zeile hat diese Arbeit ferner dadurch unterstützt, daß er 2 Pyrromethene für uns herstellte, nämlich 4.5.5′-Trimethyl-pyrromethen und 4.5.5′-Trimethyl-4′-äthyl-pyrromethen, die zur Gewinnung von zwei neuen Deutero-porphyrinen dienten.

Tabellen über die Schmelzpunkte einiger Deutero-porphyrin-dimethylester und ihrer Bromderivate findet man am Schluß dieser Arbeit. Die Tabellen enthalten die Schmelzpunkte von 4 neuen Deutero-porphyrinen, deren Synthesen in einer anderen Arbeit von Gewitz und Völker beschrieben werden.

I. Gewinnung des Cytohämins

16 Pferdeherzen wurden von Fett und Begleitstoffen befreit, durch einen Fleischwolf gedreht und mit viel kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser fast farblos war. Der gewaschene Fleischbrei wurde zentrifugiert, um die Hauptmenge Wasser zu entfernen. Gewicht etwa 35 kg.

Rohprodukt. Aus je zwei kg wurden mit 6 *l* Aceton, dem vorher 48 ccm konz. Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 zugesetzt wurden, durch 20 Min. langes Schütteln auf der Maschine die Hämine, Bluthämin und Cytohämin, entzogen. Vom fast farblos gewordenen Fleisch wurde abzentrifugiert. Die rotbraune Lösung der Hämine wurde nach Verdünnen mit $^1/_{10}$ Volumen Wasser mit 4-*n*. NH_3 bis pH 7 neutralisiert. Der ausgefallene Niederschlag, der die Hämine enthielt, wurde abzentrifugiert und mehrmals mit 80proz. Aceton gewaschen und dann wiederholt mit salzsaurem Aceton (40 ccm 2-*n*. Salzsäure auf 1 *l* Aceton) verrieben, bis nur noch wenig Hämin in Lösung ging. Das Volumen des Acetonextraktes, der die Hämine enthielt, betrug 5—7 Liter.

Die Lösung wurde mit $^1/_8$ Volumen Wasser verdünnt und mit 2-*n*. NH_3 neutralisiert. Dem ausgefallenen Niederschlag, der die Hämine enthielt, wurden nach Zentrifugieren und Waschen mit 80proz. Aceton nochmals mit schwächer salzsaurem Aceton (40 ccm 1-*n*. HCl auf 1 *l* Aceton) die Hämine entzogen. Die jetzt dunkelbraune Lösung der Hämine (Volumen etwa 2 *l*) wurde unter mäßigem Turbinieren auf 0^0 gekühlt und vorsichtig mit 1—1,2 *l* kaltem Wasser versetzt. Die dabei ausfallenden weißen bis hellbraunen Verunreinigungen wurden abzentrifugiert. Aus der Lösung wurde das Hämingemisch mit einigen ccm gesättigter Natriumacetatlösung gefällt. Es wurde abzentrifugiert, mit Wasser, dann mit 80proz. Aceton gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: ca. 1,5 g Rohprodukt.

Der Eisengehalt dieses Präparates betrug im Durchschnitt 5 Prozent.

Hämochromogenspektrum

Eine Probe wurde in 30-vol.-proz. Pyridin-Wasser gelöst und mit Hydrosulfit reduziert. Es erschien eine stärkere Bande (Protohämin) bei 557 mμ und eine

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955): 541

schwächere Bande (Cytohämin) bei 587 mμ. 4 Ansätze dieser Art ergaben etwa 6—8 g Rohprodukt.

Trennung der Hämine. 6 g Rohprodukt wurden fein gepulvert und 8-mal mit je 15 ccm Eisessig verrieben. Der unlösliche Rückstand, der viel Bluthämin, aber nur wenig Cytohämin enthielt, wurde mit Petroläther gewaschen und getrocknet. Präparat I. 3,5 g, in dem das Verhältnis von Cytohämin zu Bluthämin etwa 1:5 betrug.

Die Eisessigextrakte, die im wesentlichen das Cytohämin enthielten, wurden vereinigt in 700 ccm Petroläther eingegossen. Der ausgefallene flockige Niederschlag, der das Cytohämin enthielt, wurde abzentrifugiert, mit Petroläther gewaschen und über Natriumhydroxyd getrocknet. Präparat II. 870 mg. Enthielt vornehmlich Cytohämin neben wenig Bluthämin.

Um aus Präparat I das restliche Cytohämin zu gewinnen, wurde es in 8 ccm Pyridin und 23 ccm Chloroform gelöst und diese Lösung in ein eben nicht mehr siedendes Gemisch von 180 ccm Eisessig, dem vorher 2,7 ccm gesättigte Kochsalzlösung und 2,1 ccm konz. Salzsäure zugesetzt wurden, eingegossen. Nach 16stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag, der das Bluthämin enthielt, abzentrifugiert und verworfen. Die Mutterlauge, die das Cytohämin enthielt, wurde im Vakuum auf 30 ccm eingedampft und in 300 ccm Wasser gegossen. Der ausgefallene Niederschlag wurde mehrmals mit Eisessig ausgezogen und die Lösung mit Petroläther gefällt, gewaschen und getrocknet. Präparat III. 500 mg. Enthielt vorwiegend Cytohämin neben wenig Bluthämin.

Das Hämochromogenspektrum von Präparat II und III zeigte neben der Cytohämochromogenbande bei 587 mμ nur einen schwachen Schatten der Bluthämochromogenbande bei 557 mμ.

Präparat II und III wurden vereinigt und 15—20mal mit je 20 ccm Äther-Salzsäure (0,1 ccm 25proz. Salzsäure auf 100 ccm frisch destillierten Äther) verrieben. Die vereinigten Lösungen wurden auf die Hälfte eingeengt und in viel Petroläther gegossen. Das ausgefallene Cytohämin wurde abzentrifugiert, mit Petroläther gut gewaschen und über Natriumhydroxyd getrocknet. Ausbeute: 1070 mg.

Dieses Präparat wurde in 10 ccm salzsaurem Aceton (0.2 ccm 1-n. Salzsäure auf 50 ccm Aceton) gelöst, auf 0^0 gekühlt und langsam mit 15 ccm kalter n/10-Salzsäure versetzt. Das ausgefallene Cytohämin-chlorhydrat wurde abzentrifugiert. Die Mutterlauge enthielt noch restliches kurzwelliges Hämin. Dieser Schritt wurde 2-mal wiederholt. Zum Schluß wurde mit Wasser gut gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Wir erhielten 850 mg Cytohämin-chlorhydrat mit einem Eisengehalt von 6,2 bis 6,4 Prozent.

Kristallisation

70 mg Cytohämin-chlorhydrat wurden mit 3 ccm salzsaurem Aceton (0,2 ccm 25proz. Salzsäure auf 50 ccm Aceton) verrieben. Von wenig Ungelöstem wurde abzentrifugiert. Die Lösung wurde unter Durchblasen von Stickstoff auf 1 ccm eingeengt. Nach 1 Stunde bei 0^0 begann die Kristallisation. Am nächsten Tag wurde abzentrifugiert. Die Kristalle wurden mit 50proz. Aceton, dann mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Zur Analyse wurde 2 Stunden bei 60^0 im Hochvakuum getrocknet.

Die 1951 erhaltenen Werte entsprachen der Zusammensetzung:

Cytohämin	C 64,47; H 6,79; N 6,50; Fe 6,42; Cl 4,20.
Bluthämin	C 62,63; H 4,94; N 8,59; Fe 8,56; Cl 5,43.

Absorptionsspektrum des Cytohämins

Hauptbande	λ 430 mμ, $\beta = 2{,}9 \cdot 10^8 \frac{cm^2}{Mole}$,
Langwelligste Nebenbande	λ 587 mμ, $\beta = 0{,}64 \cdot 10^8 \frac{cm^2}{Mole}$.

II. Hydrierung des Cytohämins

Zur Hydrierung wurden 1,23 mg Cytohämin-chlorhydrat, in 0,05 ccm n/10-Natronlauge gelöst, in den Hauptraum eines Kegelgefäßes gegeben, der 10 mg Platinschwarz und 2 ccm *m*/5-Boratpuffer pH 11 enthielt. Das Cytohämin nahm in 280 Min. bei 20° 51 cmm H_2 auf; das sind 1,62 Mole H_2, von denen 1/2 Mol H_2 für die Reduktion des Eisens und etwa 1 Mol H_2 für die Reduktion einer Doppelbindung verbraucht wurden.

Wurde dieses hydrierte Cytohämin der Resorcinschmelze unterworfen, so konnte, *anders als bei der Resorcinschmelze des nicht hydrierten Cytohämins*, kein kristallisiertes Reaktionsprodukt isoliert werden. Wahrscheinlich bleibt bei der Resorcinschmelze des hydrierten Hämins die lange Kohlenstoffkette mit dem Pyrrolkern verbunden und verhindert dadurch die Kristallisation eines Deuterokörpers.

III. Deutero-porphyrin aus Cytohämin

Die Deuteroreaktion *des nicht hydrierten Cytohämins*, die wir 1953 beschrieben haben, konnte vereinfacht werden und gelang jetzt in besserer Ausbeute nach folgender Methode:

100 mg Cytohämin-chlorhydrat wurden mit 500 mg Resorcin gemischt und 10 Min. bei 187—190° geschmolzen. Die erkaltete Schmelze wurde in 20 ccm n/20-Natronlauge gelöst und mit Wasser auf 40 ccm verdünnt. Mit 40 ccm n/10-Salzsäure wurde das Cyto-deutero-hämin gefällt. Dieses Umfällen wurde 3mal wiederholt, wobei grün fluoreszierende Verunreinigungen entfernt wurden. Dann wurde mit Wasser salzfrei gewaschen. Der noch feuchte Niederschlag wurde in 30 ccm Eisessig gelöst. Unter Durchleiten von Kohlensäure wurden 5 ccm einer frisch bereiteten Eisen(II)-acetat-Eisessiglösung (0,32 g Ferrum reductum wurden in CO_2-Atmosphäre in 17 ccm Eisessig durch Kochen unter Rückfluß gelöst) und dann auf dem siedenden Wasserbad 2 ccm konz. Salzsäure hinzugefügt. Nach kurzem Erwärmen war alles Eisen abgespalten, und die Lösung zeigte die dunkelrote Porphyrinfarbe.

Die Lösung wurde in 250 ccm Wasser, welches 5 ccm konz. Salzsäure enthielt, eingegossen. Das Cyto-deutero-porphyrin blieb in Lösung. Die ausgefallenen Verunreinigungen wurden durch Filtrieren abgetrennt. Das Cyto-deutero-porphyrin wurde mit Natriumacetat ausgeflockt und der Niederschlag mit 1-*n*. Salzsäure extrahiert. Ungelöstes wurde verworfen.

Aus der Lösung wurde das Cyto-deutero-porphyrin mit Natriumacetat ausgefällt. Es wurde abzentrifugiert, mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet. 37 mg Cyto-deutero-porphyrin = 64,5% der Theorie. Die 1953 erhaltenen Analysenwerte entsprachen der Zusammensetzung:

C 69,80; H 5,86; N 11,34.

Cyto-deutero-porphyrin-dimethylester. 37 mg freies Porphyrin wurden in 12 ccm 1% HCl-haltigem Methanol gelöst und bei 0° mit trockenem Salzsäuregas gesättigt. Nach 1stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde die Lösung bei 30° im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 10 ccm Chloroform und 0,5 ccm Methanol gelöst, mit wasserfreiem Natriumcarbonat neutral geschüttelt und nach Filtrieren im Vakuum zur Trockene gebracht.

Chromatographische Reinigung. Der trockene Rückstand des Cyto-deutero-porphyrin-dimethylesters wurde in 1 ccm Chloroform (für chromatographische Zwecke benötigtes Chloroform wurde 3mal mit je 2 Volumen Wasser gewaschen und über $CaCl_2$—Na_2SO_4 getrocknet), dem 0,4 ccm Benzol und 4 Tropfen Methanol zugesetzt wurden, in der Wärme gelöst. Die Lösung wurde auf eine Al_2O_3-Säule Grad II^3, 12 × 1,5 cm, gebracht. Dann wurde die Säule mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Chloroform und Benzol gewaschen, wobei der Cyto-deutero-porphyrin-ester als einheitliche Zone durch die Säule wanderte und gefärbte Verunreinigungen zurückblieben. Das Eluat wurde im Vakuum getrocknet. Die chromatographische Reinigung wurde in gleicher Weise wiederholt, jedoch wurde der Ester dieses Mal ohne Zusatz von Methanol, in Chloroform: Benzol = 1:1, gelöst. Nach Eindampfen des Eluates wurde der Rückstand 2—3mal aus Chloroform-Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 20 mg Cyto-deutero-porphyrin-dimethylester vom Schmp. 188°. Die 1953 durchgeführte Methoxylbestimmung ergab 10,96% CH_3O.

IV. Chromsäureabbau des Cyto-deutero-porphyrins[4]

216 mg Cyto-deutero-porphyrin wurden in 12,5 ccm 50vol.proz. Schwefelsäure gelöst. Die klare Lösung wurde unter Rühren mit 12,5 g Eis versetzt und auf — 10° gekühlt. Innerhalb von 35 Min. wurden 510 mg CrO_3, in 5 ccm Wasser gelöst, entsprechend 18 Atomen Sauerstoff, zugetropft. Es wurde noch 1/2 Stunde in Eiskühlung und 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, die grüne Lösung mit Wasser auf 180 ccm verdünnt und im Apparat 5 Stunden mit Äther extrahiert. Zur Trennung in basische und saure Fraktion wurde der Ätherextrakt 2mal mit je 5 ccm 5proz. Natriumbicarbonatlösung und 2mal mit je 5 ccm Wasser ausgeschüttelt.

Im Äther verblieb das Imid.

Die so abgetrennte Hämatinsäure-Fraktion wurde mit Wasser auf 80 ccm verdünnt, mit 1-*n*. Schwefelsäure auf pH 2,5 angesäuert und im Apparat mit Äther extrahiert.

Der Ätherextrakt wurde eingeengt und der Rückstand im Vakuum über Natriumhydroxyd getrocknet.

Ausbeute: 103 mg Rohhämatinsäure. Das sind 33% mehr, als die Theorie für einen Kern verlangt.

Durch Sublimation im Ölpumpenvakuum bei 85 bis 95° wurde Oxalsäure entfernt. Der Rückstand wurde in 2 ccm Äther gelöst, und die Ätherlösung wurde tropfenweise mit Petroläther 50—70° versetzt. Von zunächst ausfallenden gelben Schmieren wurde abgegossen. Auf Zusatz von mehr Petroläther und nach Kühlen im Eisbad kristallisierte die Hämatinsäure aus. Sie wurde abzentrifugiert und mit Petroläther gewaschen.

Zum Umkristallisieren wurden die Kristalle in 1,5 ccm Essigsäure-äthylester gelöst und die Lösung vorsichtig mit 15—20 ccm Petroläther 50—70° versetzt. Nach kurzem Stehen in der Kälte kristallisierte die Hämatinsäure in langen Nadeln, die teilweise zu Nadelbüscheln vereinigt waren, aus. Schmp. 113°.

Ausbeute: 52 mg krist. Hämatinsäure. Das sind 67% der Theorie für einen Kern.

Der Mischschmelzpunkt mit Hämatinsäure aus Proto-deutero-porphyrin, welche den Schmp. 110° hatte, zeigte keine Depression.

Zur Analyse wurde die Hämatinsäure aus Cyto-deutero-porphyrin bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet.

3,44 mg Sbst., 6,51 mg CO_2, 1,52 mg H_2O. — 2,96 mg Sbst., 0,198 ccm N (23°, 761,5 mm Hg.).

$C_8H_9O_4N$ (183,15) Ber. C 52,46; H 4,95; N 7,65.
Gef. C 51,46; H 4,94; N 7,73.

Die im Äther verbliebene Imidfraktion erhielten wir durch Einengen des Äthers und Trocknen des Rückstandes im Vakuum über Natriumhydroxyd.

Ausbeute: 43,1 mg rohes Methylmaleinimid. Das sind 92% der Theorie für 1 Kern.

Das Rohimid wurde durch 2malige Sublimation im Vakuum von 4 mm Hg und 78° gereinigt.

Ausbeute: 37 mg. Das sind 80% der Theorie für einen Kern.

Aus Wasser umkristallisiert, betrug der Schmp. 106°. Der Mischschmp. mit Methylmaleinimid aus Proto-deutero-porphyrin ergab keine Depression. Zur Analyse wurde das Imid aus Cyto-deutero-porphyrin im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 1. P = — Propionsäure-methylester

Nur die β-Substituenten sind hier eingezeichnet	Schmelzpunkte	Mischschmelzpunkt mit Cyto-deutero-porphyrin-ester
Cyto-deutero-porphyrin-dimethylester	188°	—
CH_3 H / CH_3 P — H C_2H_5 / P CH_3	231°	175°
CH_3 H / CH_3 P — H H / P CH_3	216°	173°
CH_3 H / CH_3 P — CH_3 H / P CH_3	218°	170°
CH_3 H / P CH_3 — CH_3 H / P CH_3	188°	158°
CH_3 H / P CH_3 — H CH_3 / P CH_3	204°	163°
CH_3 H / P CH_3 — CH_3 P / H CH_3	285°	—
CH_3 H / CH_3 P — H CH_3 / P CH_3	280°	—
CH_3 P / CH_3 H — H CH_3 / P CH_3	300°	—

4,41 mg Sbst., 8,75 mg CO_2, 1,70 mg H_2O. — 2,95 mg Sbst., 0,319 ccm N (23°, 762 mm Hg).

$C_5H_5O_2N$ (111,09) Ber. C 54,06; H 4,54; N 12,61.
Gef. C 54,14; H 4,31; N 12,50.

Zum Vergleich wurden 250 mg Proto-deutero-porphyrin in der eben beschriebenen Weise oxydiert. Es wurden erhalten:

Saure Fraktion:

118 mg Rohhämatinsäure. Das sind 32% mehr, als die Theorie für einen Kern erfordert. 58 mg kristallisierte Hämatinsäure vom Schmelzpunkt 110°. Das sind 65% der Theorie für einen Kern.

Basische Fraktion:

47 mg rohes Methylmaleinimid. Das sind 87% der Theorie für einen Kern. 40 mg sublimiertes Maleinimid vom Schmp. 108°. Das sind 74% der Theorie für einen Kern.

Tabelle 2. P = — Propionsäure-methylester

Ausgangs-Porphyrin-ester (nur β-Substituenten eingezeichnet)	Brom-porphyrinester: Zahl der aufgenommenen Br-Atome	Brom-porphyrinester: Schmelzpunkte	Häminester Schmelzpunkte
Cyto-deutero-porphyrin-dimethylester	3	298°	218°
CH_3 H / CH_3 P — H C_2H_5 / P CH_3	2	unscharf	254°
CH_3 H / CH_3 P — H H / P CH_3	3	270°	253°
CH_3 H / CH_3 P — CH_3 H / P CH_3	2	274°	250°
CH_3 H / P CH_3 — CH_3 H / P CH_3	2	251°	265°
CH_3 H / P CH_3 — H CH_3 / P CH_3	2	238°	209°
CH_3 H / P CH_3 — CH_3 P / H CH_3	2	303°	296°
CH_3 H / CH_3 P — H CH_3 / P CH_3	2	301°	279°

V. Vergleich der Schmelzpunkte des Cyto-deutero-porphyrin-dimethylesters mit den Schmelzpunkten anderer Deutero-dimethylester

Da Cyto-deutero-porphyrin durch Spektrum und Chromsäureabbau nahe Übereinstimmung mit dem Proto-deutero-porphyrin zeigte, verglichen wir zunächst die Schmelzpunkte der reinen Proto- und Cyto-dimethylester. Der Cyto-ester schmilzt bei 188°, der Proto-ester bei 218°, beim Mischen ergab sich Depression auf 170°, so daß eine Identität beider Porphyrine ausgeschlossen erscheint. Noch größer war der Unterschied in den Schmelzpunkten gegenüber 3 Deutero-prophyrin-dimethylestern, die HANS FISCHER dargestellt hat und für die er die Schmp. 280°, 285° und 300° angegeben hat. Von 4 neuen Porphyrinen, die wir zum Vergleich herstellten*, hatten die Dimethylester die Schmelzpunkte 231°, 216°, 188° und 204°. Unter diesen war also *ein* Ester, dessen Schmelzpunkt 188° mit dem Cyto-ester übereinstimmte, doch ergab sich auch hier beim Mischen eine Depression von 188° auf 158°, so daß also auch hier eine Identität ausscheidet. In Tab. 1 folgt eine Liste der Schmelzpunkte der Dimethylester.

VI. Vergleich der Schmelzpunkte der Hämindimethylester und der bromierten Porphyrinester

Um die Vergleichsmöglichkeiten zu erweitern, haben wir von den 4 neu synthetisierten Porphyrindimethylestern die Hämin-dimethylester und die Brom-porphyrin-dimethylester dargestellt*. Tab. 2 enthält eine Zusammenstellung der gefundenen Schmelzpunkte der neuen Substanzen sowie der bereits von HANS FISCHER synthetisierten Substanzen.

Wie aus Tab. 1, so geht auch aus Tab. 2 hervor, daß das Cyto-deutero-porphyrin mit keinem der zum Vergleich herangezogenen Porphyrine identisch ist. Insbesondere sei darauf hingewiesen, daß Cyto-deutero-porphyrinester 3 Atome Brom aufnimmt, während Proto-deutero-porphyrin- ester nur 2 Atome Brom aufnimmt.

Literatur

1 WARBURG, O., und GEWITZ, H.-S., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 288 (1951), 1.
2 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292 (1953), 174.
3 Nach R. E. H. NICHOLAS, Biochem. J. 48 (1951), 309, wurde standardisiertes Al_2O_3 der Firma E. Merck in Wasser suspendiert und abgesaugt. Dann wurde es bei 120° getrocknet und zum Erkalten in einen Exsikkator gestellt. Zum Gebrauch wurde es gesiebt; 3600 Maschen pro cm^2.
4 Methode von W. KÜSTER, Liebigs Ann. Chem. 315 (1900), 182 sowie Abderhaldens Handbuch der biol. Arbeitsmethoden Abt. I, Teil 8, S. 251, 1922.

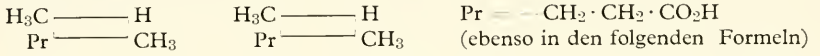
* Vgl. eine folgende Arbeit von GEWITZ und VÖLKER.

16 Über die Synthese einiger Deuteroporphyrine*

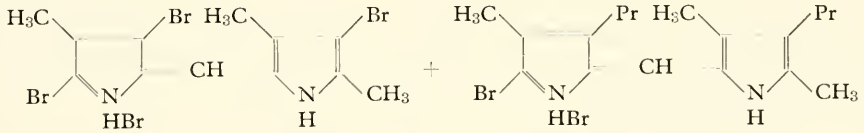
Von Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

Da die Schmelzpunkte aller bekannten Deutero-porphyrin-dimethyl-ester sich als wesentlich verschieden von dem Schmelzpunkt des Cyto-deutero-porphyrin-dimethylesters[1] erwiesen, haben wir auf Vorschlag von Herrn Warburg zu Vergleichszwecken vier neue Deutero-porphyrine synthetisiert. Von den dazu benötigten sechs Pyrromethenen verdanken wir zwei Herrn Prof. K. Zeile, drei wurden nach Vorschriften von Hans Fischer erhalten und eines wurde von uns dargestellt. Die Synthesen erfolgten durch Bernsteinsäureschmelze der entsprechenden Pyrromethene. Wir beschreiben im folgenden die Synthese der neuen Deutero-porphyrine, ihrer Methylester, ihrer Häminester und ihrer Bromderivate.

1.3.5.7-Tetramethyl-porphin-6.8-dipropionsäure

A 

Zur Synthese dienten die Pyrromethene I und II, die bereits Hans Fischer[2, 3] beschrieben hat:

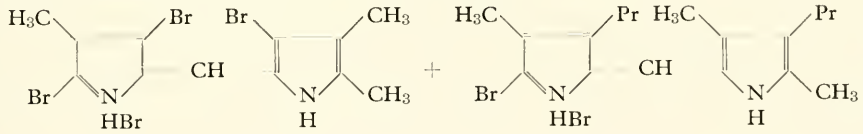
I 

II

1.4.5.7-Tetramethyl-porphin-6.8-dipropionsäure

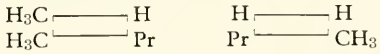
B

Die Synthese erfolgte aus den Pyrromethenen III und II[3].

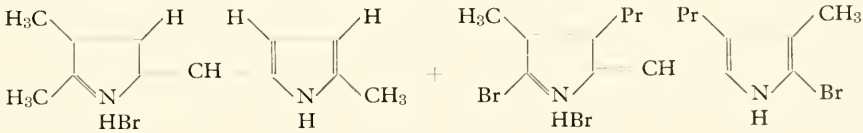
III 

II

1.5.8-Trimethyl-porphin-6.7-dipropionsäure

C 

Zur Synthese dienten die Pyrromethene IV** und V[4].

IV 

V

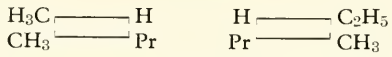
---

* Aus Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiolog. Chem. 302 (1955): 119.

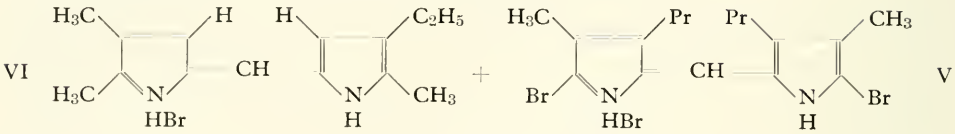
**Diese Pyrromethene stellte uns freundlicherweise Herr Prof. K. Zeile zur Verfügung.

1.5.8-Trimethyl-4-äthyl-porphin-6.7-dipropionsäure

D



Die Synthese erfolgte aus den Pyrromethenen VI und V.



Beschreibung der Versuche

A.

Pyrromethen I, 3.5.4.'-Tribrom-4. 3.' 5.'-trimethyl-pyrromethen-hydrobromid[2] wurde durch Einwirkung von Bromeisessig auf 2.4-Dimethylpyrrol dargestellt.

Pyrromethen II, 5-Brom-4.3.'5.'-trimethyl-3.4.'-dipropionsäure-pyrromethen-hydrobromid[3], wurde durch Einwirkung von Bromeisessig auf Kryptopyrrolcarbonsäure dargestellt.

1.3.5.7-Tetramethyl-porphin-6.8-dipropionsäure (A): Ein Gemisch von 0,8 g *Pyrromethen I* mit 0,8 g *Pyrromethen II* und 4,8 g Bernsteinsäure wurde in Portionen zu 1,5 g in ein auf 210° vorgewärmtes Bad gestellt und 7 Min. bei 225° verschmolzen. Die starke Bromwasserstoffentwicklung war dann fast beendet. Die Schmelze wurde mit heißem natriumacetathaltigem Wasser gewaschen. Das entstandene Porphyringemisch wurde mit Eisessig und konz. Salzsäure aus dem Rückstand extrahiert. Durch Verdünnen mit Wasser und Abschwächen der Salzsäure mit Natriumacetat wurde das Farbstoffgemisch in 3 l Äther getrieben. Der Äther wurde mehrmals mit Wasser gewaschen. Der Äther enthielt neben dem gesuchten Porphyrin noch Koproporphyrin I, entstanden durch Selbstkondensation des Pyrromethens II, sowie Tetramethylporphin und einige Bromporphyrine, die durch Selbstkondensation des Pyrromethens I entstanden waren. Zur Abtrennung des Koproporphyrins I wurde der Äther mehrmals mit zusammen 4 *l* 0,15proz. Salzsäure extrahiert. Dann wurde das gesuchte Porphyrin mit 1 *l* 1proz. Salzsäure ausgeschüttelt. Aus der salzsauren Lösung wurde das Porphyrin durch Abstumpfen mit Natriumacetat in frischen Äther getrieben. Es wurde zunächst mit 0,15 proz. Salzsäure zweimal gewaschen, um noch vorhandenes Koproporphyrin I zu entfernen. Dann wurde mit 100 ccm *n*-Salzsäure das gesuchte Porphyrin dem Äther entzogen und aus der salzsauren Lösung mit festem Natriumacetat gefällt. Es wurde abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Zur Abtrennung von Tetramethylporphin wurde der Niederschlag mit *n*/10 Natronlauge verrieben. Vom Ungelösten wurde abzentrifugiert. Das gesuchte Porphyrin wurde aus der Lösung mit wenig Eisessig gefällt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Ausb.: 48 mg, 5,9% d. Th., Salzsäurezahl 0,5.

Dimethylester von A: Zur Darstellung des Dimethylesters wurde A in 1% Salzsäure enthaltendem Methanol (48 mg Porphyrin in 16 ccm Lösung) gelöst. Die

Lösung wurde bei 0° mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt. Nach 1stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde die Lösung im Vak. bei 30° zur Trokkene eingeengt. Der Rückstand wurde in 12 ccm Chloroform gelöst, die Lösung mit wasserfreiem Natriumcarbonat neutral geschüttelt und nach Filtrieren auf ein kleines Volumen eingedampft. Auf Zusatz von heißem Methanol kristallisierte der Ester aus. 40 mg.

Chromatographische Reinigung des Dimethylesters: 40 mg Dimethylester wurden in 1,5 ccm Chloroform (Chloroform wurde für chromatographische Zwecke mehrmals mit Wasser gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet) gelöst und mit 1,5 ccm Benzol verdünnt. Diese Lösung wurde auf eine Al_2O_3-Grad II*-Säule, 15×2 cm, gebracht. Die Säule wurde mit einer Mischung aus gleichen Teilen Chloroform und Benzol gewaschen. Im oberen Teil der Säule wurden Koproporphyrin-I-Ester sowie einige unbekannte Porphyrinester zurückgehalten, während der gesuchte Porphyrin-dimethylester als 1—2 cm breite, einheitliche Zone durch die Säule wanderte. Das Eluat wurde im Vak. getrocknet. Der Rückstand wurde in der gleichen Weise nochmals chromatographisch gereinigt. Das Eluat wurde zur Trockene eingeengt. Der trockene Rückstand wurde in 2 ccm Chloroform gelöst. Zur Kristallisation wurde die Lösung mit 3 ccm heißem Methanol versetzt und sofort gekühlt. Die ausgefallenen Kristalle, abzentrifugiert und mit Methanol gewaschen, schmelzen nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol bei 188°. Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

3,77 mg Sbst., 9,83 mg CO_2, 2,06 mg H_2O. — 4,30 mg Sbst., 0,401 ccm N (28°, 756, 4 Torr). — 3,60 mg Sbst., 3,92 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{32}H_{34}O_4N_4$ (538,62). Ber. C 71,35 H 6,36 N 10,40 CH_3O 11,52
Gef. C 71,15 H 6,12 N 10,52 CH_3O 11,26

Eisensalz des Porphyrin-dimethylesters: 5 mg des Dimethylesters wurden in 0,5 ccm Eisessig-Kochsalz gelöst. In Kohlensäure-Atmosphäre wurde mit 0,5 ccm frisch bereiteter Eisen(II)-acetat-Eisessig-Kochsalzlösung (0,33 g Ferrum reductum und 0,33 g Natriumchlorid wurden im Kohlendioxydstrom in 25 ccm Eisessig durch Kochen unter Rückfluß gelöst) versetzt und 15 Min. auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Bereits in der Wärme kristallisierte der Häminester in rautenförmigen Kristallen aus. Er wurde mit Eisessig, dann mit Äther gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus heißem Eisessig schmolzen die Kristalle bei 265°. — Zur Eisenbestimmung wurde im Vak. getrocknet.

0,76 mg Sbst., 0,0695 mg Fe.
$C_{32}H_{32}O_4N_4 \cdot FeCl$ (627,92). Ber. Fe 8,91 Gef. Fe 9,15

Bromderivat des Porphyrin-dimethylesters: 35 mg des *Dimethylesters* wurden in 7 ccm Eisessig in der Wärme gelöst. Nach Abkühlen wurde die Lösung mit 0,42 ccm einer 25proz. *Brom*-Eisessiglösung bromiert. Nach mehrstündigem Stehenlassen wurde das ausgefallene Perbromid in 2 ccm Aceton gelöst. Die Lösung

---

* Al_2O_3-Grad II wurde nach einer Vorschrift von R. E. H. Nicholas, Biochem. J. 48, 309 (1951), aus Al_2O_3 standardisiert der Firma E. Merck durch Aufschlämmen in Wasser und Trocknen bei 120° erhalten.

wurde nach 3 Stunden mit 15 ccm Chloroform vermischt. Die Chloroformlösung, die das Bromderivat enthielt, wurde zur Entfernung von Aceton und Bromaceton dreimal mit Wasser gewaschen. Dann wurde die Lösung durch trockene Filter filtriert, auf ein kleines Volumen eingedampft, mit 1 ccm Benzol vermischt und auf eine Al_2O_3-Grad II-Säule gebracht. Die Säule wurde mit Chloroform:Benzol = 1:1 gewaschen. Die Hauptmenge wanderte als einheitliche Zone durch die Säule. Das Eluat wurde getrocknet, und der Rückstand wurde zweimal aus viel Chloroform mit wenig Methanol in der Wärme umkristallisiert. Lange Nadeln vom Schmp. 251°. Ausb. 36 mg (79% d. Th.).

Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

3,86 mg Sbst., 7,81 mg CO_2, 1,66 mg H_2O. — 4,29 mg Sbst., 0,304 ccm N (28°, 752,2 Torr). — 4,47 mg Sbst., 1,025 mg Br. — 1,98 mg Sbst., 1,53 ccm *n*/50 Natriumthiosulfat.

$C_{32}H_{32}O_4N_4Br_2$ (696,44).	Ber.	C 55,18	H 4,63	N 8,05	Br 22,95	CH_3O 8,91
	Gef.	C 55,21	H 4,81	N 7,95	Br 22,92	CH_3O 7,99

B.

3-Brom-4.4.'5'-trimethyl-5-carboxy-pyrromethen-hydrobromid: 1 g 3-Brom-4-methyl-5-carboxy-pyrrol-aldehyd-(2) wurden mit 0,4 g *2-3-Dimethyl-pyrrol* gut verrieben. Dann wurden auf einmal 0,5 ccm Eisessig zugegeben und kräftig verrührt, wobei alles zu einer festen Masse erstarrte. Unter Kühlung wurde mit 1 ccm 48proz. Bromwasserstoffsäure versetzt. Nach kurzem Stehen wurde der ausgefallene Kristallbrei abgesaugt und mit wenig Eisessig und Äther gewaschen. Ausb. 1,5 g 5-Carboxy-pyrromethen.

Pyrromethen III, 3.5.3'-Tribrom-4.4.'5'-trimethyl-pyrromethen-hydrobromid: 1,5 g des *5-Carboxy-pyrromethens* wurden mit 4 ccm Ameisensäure verrieben und nach Zutropfen von 0,5 ccm Brom, 2 Min. auf 90—95° erwärmt. Schon in der Wärme begann die Kristallisation. Es wurde abgesaugt und mit Eisessig und Äther gewaschen. Dieses Präparat wurde nochmals in 16 ccm Ameisensäure durch Erwärmen gelöst und bei 80° mit 0,3 ccm *Brom* versetzt. Nach Abkühlen kristallisierte das *Pyrromethen III* in roten Prismen aus, die mit Eisessig und Äther gewaschen und getrocknet wurden. Ausb. 1,8 g (90% d. Th.). Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

3,94 mg Sbst., 4,15 mg CO_2, 0,94 mg H_2O. — 4,44 mg Sbst., 0,218 ccm N (28°, 752,3 Torr.) — 3,14 mg Sbst., 1,982 mg Br.

$C_{12}H_{12}N_2Br_4$ (503,89).	Ber.	C 28,60	H 2,40	N 5,56	Br 63,44
	Gef.	C 28,74	H 2,67	N 5,51	Br 63,11

1.4.5.7-Tetramethyl-porphin-6.8-dipropionsäure (B): Ein Gemisch von 1,65 g *Pyrromethen III* und 1,5 g *Pyrromethen II* mit 9,5 g Bernsteinsäure wurde auf 7 Reagenzgläser verteilt und 10 Min. bei 215 bis 225° geschmolzen. Die erkaltete Schmelze wurde mit heißem natriumacetathaltigem Wasser ausgekocht und der schwarze Rückstand mit 80 ccm Eisessig und 80 ccm konz. Salzsäure extrahiert. Die salzsaure Lösung, die das Porphyringemisch enthielt, wurde in der für die Synthese von A angegebenen Weise über Äther/Salzsäure aufgearbeitet. Die so

erhaltene salzsaure Lösung des gesuchten Porphyrins wurde mit Natriumacetat versetzt. Das ausgeflockte Porphyrin wurde abzentrifugiert, mit Wasser gut gewaschen und getrocknet. Ausb. 33 mg (2,12% d. Th.). Salzsäurezahl 0,5.

Dimethylester von B: 85 mg Porphyrin B wurden in 30 ccm 1% Chlorwasserstoff enthaltendem Methanol gelöst, die Lösung in der Kälte mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt und wie bei der Darstellung des Esters von A weiterverarbeitet. Die neutrale Chloroformlösung wurde zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 2 ccm Chloroform gelöst und zur Kristallisation mit 2 Vol.-Tln. Methanol versetzt. Die Kristalle wurden abzentrifugiert und mit Methanol gewaschen.

Chromatographische Reinigung des Dimethylesters: Die noch unreinen Kristalle wurden in 1,5 ccm Chloroform gelöst und mit 1,5 ccm Benzol versetzt. Die Lösung ließen wir über eine Al_2O_3-Grad II-Säule laufen. Gewaschen wurde mit Chloroform: Benzol = 1:1. Es wurden mehrere schwache Zonen abgetrennt. Das Eluat, das den gesuchten Dimethylester enthielt, wurde im Vak. getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde aus Chloroform-Methanol zweimal umkristallisiert. Der Dimethylester kristallisierte in langen Nadeln vom Schmp. 203°. Ausb.: 48 mg. Zur Analyse wurde im Hochvak. konstant getrocknet.

3,44 mg Sbst., 9,02 mg CO_2, 2,02 mg H_2O. — 3,46 mg Sbst., 0,323 ccm N (29°, 756,4 Torr). — 2,53 mg Sbst., 2,76 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{32}H_{34}O_4N_4$ (538,62).	Ber.	C 71,35	H 6.36	N 10,40	CH_3O 11,52
	Gef.	C 71,55	H 6,57	N 10,50	CH_3O 11,33

Eisensalz des Porphyrin-dimethylesters: 5 mg des Porphyrinesters wurden zur Eiseneinführung mit 0,5 ccm Eisen(II)-acetat-Eisessiglösung 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach mehrstündigem Stehenlassen wurden die Kristalle abzentrifugiert, gewaschen und aus heißem Eisessig umkristallisiert. Vier- und sechsseitige Platten vom Schmp. 209°. Zur Eisenbestimmung wurde im Vak. getrocknet. 1,10 mg Sbst., 0,100 mg Fe.

$C_{32}H_{32}O_4N_4 \cdot FeCl$ (627,92). Ber. Fe 8,91 Gef. Fe 9,09

Bromderivat des Porphyrin-dimethylesters: 25 mg des *Porphyrindimethylesters* wurden in 10 ccm Eisessig in der Wärme gelöst und nach Abkühlen mit 0,3 ccm 25proz. *Brom*-Eisessiglösung versetzt. Die ausgefallene Perbromverbindung wurde mit 1,3 ccm Aceton zersetzt. Die Lösung wurde mit 15 ccm Chloroform vermischt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Chloroformlösung, die das Bromderivat enthielt, wurde getrocknet, auf 2 ccm eingeengt und mit 3 ccm heißem Methanol versetzt. Der auskristallisierte Bromporphyrinester wurde mit Methanol gewaschen und nach chromatographischer Reinigung über Al_2O_3-Grad II noch zweimal aus Chloroform-Methanol umkristallisiert. Nadeln vom Schmp. 238°. Ausb.: 23 mg (71% d. Th.). Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

4,11 mg Sbst., 8,28 mg CO_2, 1,78 mg H_2O. — 3,92 mg Sbst., 0,286 ccm N (29°, 752,1 Torr). — 3,54 mg Sbst., 0,816 mg Br. — 2,60 mg Sbst., 2,05 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{32}H_{32}O_4N_4Br_2$ (696,44).	Ber.	C 55,18	H 4,63	N 8,05	Br 22,95	CH_3O 8,91
	Gef.	C 54,98	H 4,85	N 8,16	Br 23,06	CH_3O 8,15

C.

1.5.8-Trimethyl-porphin-6.7-dipropionsäure C: Die Mischung von 1,44 g *Pyrromethen IV*[4] mit 3,0 g *Pyrromethen V*[5] und 13 g Bernsteinsäure wurde in Portionen zu etwa 1,5 g 45 Min. bei 185° geschmolzen, die erkaltete Schmelze fein gepulvert und mit heißem natriumacetathaltigem Wasser gewaschen. Der schwarze Rückstand, der das Porphyrin enthielt, wurde in 70 ccm Eisessig und 70 ccm konz. Salzsäure gelöst. Die Lösung wurde mit Wasser auf 10% Salzsäurekonzentration verdünnt, von ausgefallenen Verunreinigungen wurde abzentrifugiert; das gesuchte Porphyrin flockte aus der Lösung durch Zusatz von Natriumacetat aus. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Mit 5proz. Salzsäure wurde daraus das jetzt schon ziemlich reine Porphyrin extrahiert. Durch Verdünnen mit Wasser unter Zusatz von Natriumacetat wurde das Porphyrin in 3 *l* Äther getrieben. Aus der Ätherlösung wurden zunächst mit 1,5 *l* 0,1proz. Salzsäure schwächer basische Verunreinigungen abgetrennt. Das gesuchte Porphyrin ließ sich dann glatt mit 1proz. Salzsäure extrahieren. Es wurde aus der salzsauren Lösung noch mal in frischen Äther getrieben und aus der Ätherlösung mit wenig *n*-Salzsäure ausgeschüttelt. Schließlich wurde das Porphyrin aus der salzsauren Lösung mit Natriumacetat amorph gefällt, mit Wasser salzfrei gewaschen und getrocknet. Ausb. 48,5 mg (1,8% d. Th.). Aus Äther wurde das Porphyrin in kleinen Kristallen erhalten, die bis 300° nicht schmolzen. Salzsäurezahl 0,5.

Dimethylester von C: In die Lösung des Porphyrins in 1% Salzsäure enthaltendem Methanol (3 mg in 1 ccm Lösungsmittel) wurde in der Kälte bis zur Sättigung trockener Chlorwasserstoff eingeleitet. Nach kurzem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde die Lösung im Vak. zur Trockene eingeengt, der trockene Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit wasserfreiem Natriumcarbonat neutral geschüttelt. Die Lösung wurde nach Filtrieren auf ein kleines Volumen eingeengt; nach Zusatz von 2 Vol-Tln. heißem Methanol kristallisierte der Dimethylester aus. Die chromatographische Reinigung des Esters erfolgte über eine Al_2O_3-Grad II-Säule. Das Eluat des gesuchten Dimethylesters wurde eingedampft, der Rückstand dreimal aus Chloroform-Methanol umkristallisiert. Der Ester kristallisierte in schräg abgeschnittenen Blättchen vom Schmp. 217°. Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

4,29 mg Sbst., 11,18 mg CO_2, 2,41 mg H_2O. — 3,71 mg Sbst., 0,349 ccm N (28°, 754,4 Torr). — 2,55 mg Sbst., 2,77 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{31}H_{32}O_4N_4$ (524,60).	Ber.	C 70,97	H 6,15	N 10,68	CH_3O 11,83
	Gef.	C 71,12	H 6,29	N 10,59	CH_3O 11,23

Eisensalz des Porphyrin-dimethylesters: Der Hämindimethylester wurde, wie bei dem entspr. Derivat von A beschrieben, dargestellt. Er kristallisierte aus heißem Eisessig in ellipsoidförmigen Kristallen vom Schmp. 253°. Zur Eisenbestimmung wurde im Vak. getrocknet. 0,92 mg Sbst., 0,0855 mg Fe.

$C_{31}H_{30}O_4N_4 \cdot FeCl$ (613,90). Ber. Fe 9,10 Gef. Fe 9,29

Bromderivat des Porphyrin-dimethylesters: 25 mg C wurden in 9 ccm heißem Eisessig gelöst und nach Abkühlen mit 2 ccm 10proz. und 0,2 ccm 25proz. *Brom-*

Eisessiglösung versetzt. Nach 3stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur, wobei nur wenig Perbromid ausgefallen war, wurde mit 10 ccm Aceton versetzt und 3 Stdn. reagieren gelassen. Die mischfarbene rot-grüne Lösung wurde im Vak. eingeengt. Der trockene Rückstand wurde in 5 ccm Pyridin gelöst. Aus der Lösung wurde das Bromporphyrin durch Verdünnen mit Wasser unter Zusatz von wenig Eisessig in Äther getrieben. Das Pyridin wurde mit 4proz. Salzsäure ausgewaschen. Dann wurde der Äther zur Entfernung von unvollständig bromiertem Porphyrin mehrmals mit 8proz. Salzsäure ausgeschüttelt. Nun wurde das Tribromporphyrin dem Äther mit 18proz. Salzsäure entzogen; es wurde aus der salzsauren Lösung wieder in Äther getrieben und die Fraktionierung mit Salzsäure wiederholt. Aus der so erhaltenen salzsauren Lösung wurde das *Tribromporphyrin* durch Abstumpfen mit Natriumacetat in frischen Äther getrieben. Der Äther wurde neutral gewaschen und mit Calciumchlorid getrocknet. Beim Einengen der Ätherlösung kristallisierte das Bromporphyrin in gekrümmten Nadeln aus. Salzsäurezahl 13.

Die Darstellung des *Tribromporphyrin-dimethylesters* erfolgte aus dem Tribromporphyrin durch Veresterung mit Methanol-Salzsäure in der Kälte. Der Ester kristallisierte aus Chloroform-Methanol in derben Spießen, die nach wiederholtem Umkristallisieren die Form von Nadeln annahmen; Schmp. 270°. Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

3,72 mg Sbst., 6,75 mg CO_2, 1,29 mg H_2O. — 2,06 mg Sbst., 0,138 ccm N (28°, 754,3 Torr). — 1,52 mg Sbst., 0,473 mg Br.

$C_{31}H_{29}N_4O_4Br_3$ (761, 32).	Ber.	C 48,90	H 3,84	N 7,36	Br 31,49
	Gef.	C 49,52	H 3,88	N 7,54	Br 31,11

D.

1.5.8-Trimethyl-4-äthyl-porphin-6.7-dipropionsäure D: Das Gemisch von 1,6 g *Pyrromethen VI*[4] mit 3 g *Pyrromethen V*[5] und 13,8 g Bernsteinsäure wurde in Portionen zu je 1,5 g 45 Min. bei 190° geschmolzen. Die reichliche Bromwasserstoffentwicklung war dann fast beendet. Die weitere Aufarbeitung der Schmelze sowie die Äther-Salzsäure-Fraktionierung, erfolgte wie bei der Synthese von C beschrieben wurde. Ausb. 72 mg (2,5% d. Th.). Das Porphyrin kristallisierte aus Äther in gebogenen Nadeln, die bis 300° nicht schmolzen. Salzsäurezahl 0,65.

Dimethylester von D: 72 mg D wurden mit 24 ccm salzsaurem Methanol in der Kälte verestert. Der Ester, über Al_2O_3-Grad II gereinigt, schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol bei 231°. Zur Analyse wurde im Hochvak. bei 60° getrocknet.

3,34 mg Sbst., 8,80 mg CO_2, 2,01 mg H_2O. — 4,16 mg Sbst., 0,377 ccm N (29°, 754,3 Torr). — 2,64 mg Sbst., 2,82 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{33}H_{36}O_4N_4$ (552,65).	Ber.	C 71,71	H 6,56	N 10,13	CH_3O 11,23
	Gef.	C 71,90	H 6,73	N 10,17	CH_3O 11,05

Eisensalz des Porphyrin-dimethylesters: 5 mg *Porphyrin-ester* wurden in 0,5 ccm Eisessig-Kochsalz gelöst und mit 0,5 ccm Eisen(II)-acetat-Eisessig-Kochsalzlösung 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden die Kristalle abzentrifugiert, mit Eisessig und Äther gewaschen und aus heißem Eis-

essig umkristallisiert. Viereckige Platten vom Schmp. 254°. Zur Eisenbestimmung wurde im Hochvak. getrocknet.

1,18 mg Sbst., 0,102 mg Fe.

$C_{33}H_{34}O_4N_4 \cdot FeCl$ (641,95). Ber. Fe 8,70 Gef. Fe 8,64

Bromderivat des Porphyrin-dimethylesters: 25 mg *Porphyrin-dimethylester* wurden in 8 ccm Eisessig gelöst und mit 0,3 ccm einer 25proz. *Brom*-Eisessiglösung versetzt. Die weitere Aufarbeitung geschah in der für das entspr. Derivat von A angegebenen Weise. Der Bromporphyrinester wurde chromatographisch gereinigt und kristallisierte aus Chloroform-Methanol in kleinen Stäbchen. Der Schmelzpunkt war sehr unscharf und konnte auch durch öfteres Umkristallisieren nichtverbessert werden. Zur Analyse wurde bei 60° im Hochvak. getrocknet.

3,63 mg Sbst., 7,46 mg CO_2, 1,66 mg H_2O. — 4,08 mg Sbst., 0,287 ccm N (28°, 754,5 Torr). — 3,59 mg Sbst., 0,799 mg Br. — 2,44 mg Sbst., 2,01 ccm *n*/50-Natriumthiosulfat.

$C_{33}H_{34}O_4N_4Br_2$ (710,46).	Ber.	C 55,79	H 4,82	N 7,89	Br 22,50	CH_3O 8,74
	Gef.	C 56,08	H 5,12	N 7,92	Br 22,27	CH_3O 8,52

Herrn Arnold Lehmann danken wir für die Ausführung der Analysen.

Zusammenfassung

Vier neue Deuteroporphyrine, ihre Dimethylester, Hämin-Dimethylester und Bromderivate werden dargestellt.

Summary

The preparation is described of four new deuteroporphyrins, their dimethyl esters, the dimethyl ester of haemin and bromo-derivatives.

Literatur

1 Warburg, O., und Gewitz, H. S., diese Z. 288 (1951), 1; 292 (1953), 174.
2 Fischer, H., und Scheyer, H., Liebigs Ann. Chem. 434 (1923), 248.
3 Fischer, H., und Andersag, H., Liebigs Ann. Chem. 450 (1926), 212.
4 Liebigs Ann. Chem. 458 (1927), 135.

17 Versuche mit Ascites-Tumorzellen*

Von Otto Warburg und Ernst Hiepler

Messung der Zymohexase in Ascites-Serum unter aeroben und anaeroben Bedingungen. — Messung der Atmung und Gärung der Ascites-Zellen in Ascites-Serum. — Vergleich der Stoffwechsel-Kapazität der Ascites-Zellen mit ihrem tatsächlichen Stoffwechsel im Tierkörper.

Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors sind zuerst von Lettré für biochemische Versuche benutzt und empfohlen worden[1]. Dr. Georg Klein[2] (Karolinisches Institut, Stockholm) verdanken wir unsere Impfzellen. Wir impfen 0,2 cm^3 des etwa 6tägigen Ascites und entnehmen den Ascites nach einigen Tagen unter Zusatz von 0,1 mg Heparin pro cm^3. Zur Volum- und Gewichtsbestimmung der Zellen zentrifugieren wir aliquote Teile vor jedem Versuch im Hämatokriten bis zur Volumkonstanz und wägen die Zellen, nach Abgießen des Serums, ohne sie vorher zu waschen. Die Trockensubstanz enthält also immer ein wenig Serum, wodurch die Q-Werte etwas kleiner erscheinen, als sie tatsächlich sind.

1. Zymohexase

wurde mit der optischen Methode[3] in Ascites-Serum gemessen, und zwar bei 38°. „W" ist im folgenden der natürliche Logarithmus der Lichtschwächung für die Wellenlänge 345 mμ, für $d = 1$ cm, pro Stunde, umgerechnet auf unverdünntes Serum.

Jedes frische Ascites-Serum, das wir prüften, enthielt Zymohexase. W war von der Größenordnung 100. Wurde aus dem Tier entnommener Ascites bei 38° in Kästchen so bewegt, daß die Zellen nicht sedimentierten, so blieb die Zymohexase im Ascites-Serum stundenlang konstant, wenn die Bedingungen aerob waren.

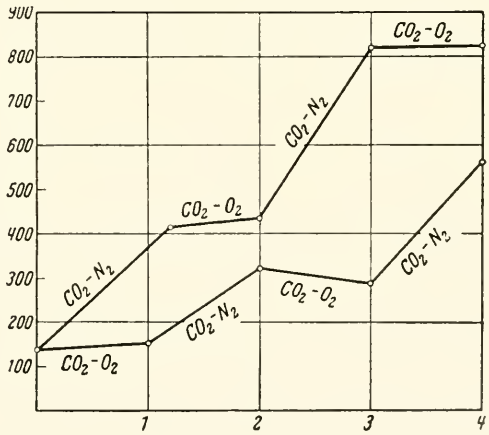


Abb. 1. Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen und umgekehrt. Ohne Zusatz von Glucose. 38°. 1 cm^3 Ascites enthielt 325 mm^3 Zellen = 57 mg Trockensubstanz. Beide Kurven wurden für aliquote Teile desselben Ascites erhalten. Der CO_2-Gehalt im Gasraum war anaerob und aerob 5 Vol.%. Ordinate: W Zymohexase in Ascites-Serum, Abszisse: Zeit in Stunden.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 7b (1952): 193.

Anaerob jedoch nahm die Zymohexase erheblich zu. Abb. 1 ist die graphische Darstellung eines Versuchs, bei dem in Intervallen von je 1 Stunde abwechselnd aerobe oder anaerobe Bedingungen erzeugt wurden.

Zweifellos rührt die Zymohexase in dem frischen Ascites-Serum von den anaeroben Bedingungen her, unter denen sich die Zellen im lebenden Tier im wesentlichen befinden; und wahrscheinlich ist die früher gefundene Zymohexase[3] im Blutserum von tumortragenden Ratten ein Zeichen dafür, daß sich Teile der soliden Tumoren im lebenden Tier unter anaeroben Bedingungen befinden.

Bei Gegenwart von Glucose wird unter anaeroben Bedingungen weniger Zymohexase von den Ascites-Zellen abgegeben als bei Abwesenheit von Glucose. Da aber, wegen der Größe der Gärung, unter anaeroben Bedingungen auch Zuckermangel herrscht, so ändert dies an unseren Schlußfolgerungen nichts.

2. Atmung und Gärung

der Ascites-Zellen wurden in Ascites-Serum mit dem für Blutserum[4] beschriebenen Methoden in Kästchen von 3—5 cm^3 Inhalt gemessen. Dabei mußte der Ascites, damit die manometrischen Ausschläge nicht zu groß wurden, *mit Ascites-Serum* auf das 50- bis 200fache verdünnt werden. Der zum Versuch verwendete Ascites durfte nur 1,5—3 mm^3 Zellen pro cm^3 enthalten, während unverdünnter Ascites 100—400 mm^3 Zellen pro cm^3 enthält. Je 1 cm^3 verdünnter Ascites wurde in ein Kästchen eingefüllt.

Ascites-Serum enthält — wegen der großen Zelldichte und der großen Gärung — im allgemeinen keinen Zucker, dafür aber viel Milchsäure, nämlich 1—2 mg pro cm^3. Bewegt man den verdünnten Ascites, ohne Zusatz von Zucker, in den Kästchen bei 38° in 5% CO_2-Luft, so veratmen die Zellen fast ausschließlich Milchsäure, wie man durch Sauerstoff-, Bicarbonat- und Milchsäurebestimmungen feststellen kann. CO_2/O_2 beträgt dabei nur 0,67, weil $^1/_3$ der entstehenden Atmungskohlensäure durch das freiwerdende Na gebunden wird, wobei also der Bicarbonatgehalt des Serums zunimmt. Q_{O_2} beträgt —5 bis —10.

Bei Zusatz von Zucker (2mg pro cm^3) findet man die folgenden Stoffwechselgrößen, die 3—6 Stunden nahezu konstant bleiben können (mm^3 pro mg Trockengewicht und Stunde):

$$Q_M^{N_2} = +\ 45 \text{ bis } 55$$
$$Q_M^{O_2} = +\ 35 \text{ bis } 45$$
$$Q_{O_2} = -\ 5 \text{ bis } -15.$$

Ist die Atmung klein, so wirkt sie oft mit dem normalen Meyerhof-Quotienten 2 auf die Gärung. Ist die Atmung groß, so wirkt sie gar nicht oder nur wenig auf die Gärung. Immer ist das Ergebnis, wie bei den Schnitten solider Tumoren, daß eine große aerobe Glykolyse übrig bleibt.*

---

* *Zusatz 1961.* Diese Angabe stimmt mit unsern späteren Erfahrungen nicht überein. In sehr vielen Versuchen der letzten Jahre haben wir gefunden, daß der Meyerhof-Quotient der Ascites-Krebszellen in Serum größer als 2 ist, also größer als in embryonalen Zellen und im allgemeinen zwischen 3 und 5 liegt. — Auch der

Der einzige Unterschied gegenüber den Versuchen mit Tumorschnitten ist die Größe von Q_M, die anaerob für Jensen-Sarkome = 36—38 gefunden wurde, während wir hier 45—55 finden. Wir schließen daraus, daß die Schnitte unserer Jensen-Sarkome im Mittel $^{37}/_{50} \times 100 = 74\%$ Krebszellen enthielten, während 26% Bindegewebe war, aus histologischen Gründen eine durchaus wahrscheinliche Zusammensetzung.

Gegen die Berechnung der Gärung der Tumoren aus den Versuchen mit Schnitten des Jensen-Sarkoms wurde eingewendet[5], aus den Schnitten werde während der manometrischen Messungen so viel Substanz in die umgebende Flüssigkeit ausgeschüttelt, daß das Schnitt-Endgewicht nur halb so groß sei wie das Schnitt-Anfangsgewicht; daß also bei der Berechnung der Q_M-Werte aus dem Endgewicht die Gärung viel zu groß gefunden werde; in Wirklichkeit sei $Q_M^{N_2}$ nicht 37, sondern nur 18. Offenbar ist das Umgekehrte richtig. $Q_M^{N_2}$ reiner Krebszellen beträgt nicht 18, sondern im Mittel 50.

3. Stoffwechsel der Ascites-Zellen im Körper*

Wenn 1 cm³ Ascites im Mittel 250 mm³ Zellen enthält und wenn eine Maus 5 cm³ Ascites enthält, so enthält ihr gesamter Ascites

$$5 \cdot 250 \cdot 0{,}175 = 220 \text{ mg Trockensubstanz,}$$

die pro Stunde $220 \times 50 = 11\,000$ mm³ Milchsäure entwickeln oder 44 mg Glucose zu Milchsäure vergären können, während der gesamte Blutzucker einer Maus von der Größenordnung 4 mg ist.

Man sieht aus dieser Rechnung, daß die gefundenen Stoffwechselgrößen im Körper nicht verwirklicht werden können und daß die Ascitesflüssigkeit im Körper, wie man es auch tatsächlich findet, nur sehr wenig gärfähigen Zucker enthalten kann. Man kann sich davon überzeugen, indem man von frisch entnommenem Ascites einen Teil sofort auf 0° abkühlt und zentrifugiert, einen anderen Teil bei 38° stehen läßt. Bestimmt man dann nach einiger Zeit das Bicarbonat in dem Serum der beiden Proben, so findet man, daß das Bicarbonat bei 38° nicht abgenommen hat; während es sofort abnimmt, wenn man zu Ascites Zucker zusetzt.

Offenbar hängt der Verbrauch der Krebszellen an Zucker und, wie wir hinzu-

---

hier angegebene Grenzwert —15 für die Atmung der Ascites-Krebszellen stimmt nicht mit unsern späteren Versuchen überein. Wir fanden später —5 bis —8 für die Atmung der Ascites-Krebszellen. Andrerseits ist die anaerobe Gärung meistens höher, als hier angegeben, nämlich 70.

* *Zusatz 1961.* A. Kemp und B. Mendel (Nature 180 [1957], 131) haben diese Frage 1957 beantwortet. Den Krebszellen wird der zur maximalen Gärung notwendige Zucker dadurch zur Verfügung gestellt, daß die durch Gärung entstandene Milchsäure in der Leber immer wieder zu Glykogen resynthetisiert und von der Leber als Zucker in den Kreislauf gegeben wird. Die Oxydationsenergie der Leber liefert also die Gärungsenergie für die Krebszellen.

fügen wollen, ihr Verbrauch an Sauerstoff, nicht von der Stoffwechsel-*Kapazität* der Krebszellen ab, sondern von den relativ kleinen Mengen an Zucker und Sauerstoff, die durch Diffusion oder Konvektion in den Ascites gelangen. Daß die Ascites-Zellen trotzdem im Körper am Leben bleiben, ist erstaunlich und gibt zu der Frage Anlaß, mit wie wenig Energie Krebszellen im Körper auskommen können.

Literatur

1 Lettré, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 268 (1941), 59; Z. Krebsforschg. 57 (1950), 1; Naturwiss. 38 (1951), 490.
2 Klein, Georg, The Production of Ascites Tumors, Uppsala 1951; Cancer 3 (1950), 1052.
3 Warburg, O., Wasserstoffübertragende Fermente, Cantor-Verlag, Freiburg (Baden).
4 Warburg, O., Stoffwechsel der Tumoren. Verlag Springer, Berlin 1926.
5 J. National Cancer Institute 2 (1941), 201.

18 Weiterentwicklung der Methoden zur Messung der Photosynthese*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl, Wolfgang Buchholz und Walter Schröder

Die durch die Addition der Atmung bedingte Unsicherheit bei Messungen der Photosynthese ist dadurch beseitigt worden, daß durch physikalische und biologische Maßnahmen die Atmung zu einem zu vernachlässigenden Korrektionsglied heruntergedrückt wurde. Die Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese ist dadurch einfacher und sicherer geworden.

Wenn in der Photosynthese Sauerstoff entsteht und in der Atmung Sauerstoff verbraucht wird, so ist der im Licht von der Zelle abgegebene, tatsächlich gewonnene Sauerstoff:

$$\text{Gewinn} = \text{Photosynthese} - \text{Atmung}, \qquad [1]$$

eine Gleichung, die immer richtig ist, wie sich auch die Atmung im Licht verhalten mag, ob sie abnehmen, zunehmen oder konstant bleiben mag. Immer wird von der Zelle nur der um die jeweilige Atmung verminderte Sauerstoff abgegeben.

Bestimmt man aber die Atmung im Dunkeln und berechnet die Photosynthese mit Hilfe der Gleichung:

$$\text{Gewinn} = \text{Photosynthese} - \text{Dunkelatmung},$$

so führt man eine im Dunkeln gemessene Atmung in die Hell-Gleichung [1] ein und macht dabei die unsichere Annahme:

$$\text{Hellatmung} = \text{Dunkelatmung}.$$

Mit dieser Unsicherheit sind alle bisherigen Bestimmungen der Photosynthese behaftet.

Offenbar könnte man hier Abhilfe schaffen, wenn man so stark belichten würde, daß die Atmung klein gegen die Photosynthese würde. Dann würde [1] übergehen in:

$$\text{Gewinn} = \text{Photosynthese}, \qquad [2]$$

womit die Bestimmung der Photosynthese einfacher und sicherer geworden wäre: Einfacher, weil man die Belichtung nicht mehr zwecks Atmungsmessung unterbrechen müßte; und sicherer, weil die Photosynthese ohne jede Rechnung aus einer experimentell genau bestimmbaren Größe erhalten würde.

Einige Zahlen mögen das Gesagte erläutern. Chlorella werde mit wachsenden Intensitäten einer beliebigen Wellenlänge belichtet, der Quantenbedarf der Photosynthese sei bei allen Intensitäten $1/\varphi' = 3$. Belichtet man zunächst so schwach, daß die Atmung gerade kompensiert, daß also der Kompensationsgrad gleich 1 ist, so ist der Gewinn Null und der Quantenbedarf des Gewinns $1/\varphi$ unendlich groß. Bei dem beliebigen Kompensationsgrad ϱ ist der Quantenbedarf des Gewinns:

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{1}{\varphi'} \cdot \frac{\varrho}{\varrho - 1} \qquad [3]$$

---

* Auszüge aus Zeitschrift für Naturforschung 8b (1953): 675. Nur solche Teile dieser Arbeit sind hier abgedruckt, die methodische Fortschritte bedeuten.

Berechnen wir mit Hilfe von [3] den Quantenbedarf des Gewinns für verschiedene Werte von ϱ, während der Quantenbedarf der Photosynthese konstant gleich 3 bleiben soll, so erhalten wir:

Kompensationsgrad der Atmung $[\varrho]$	Quantenbedarf des Gewinns $\left[\frac{1}{\varphi} = \frac{1}{\varphi'} \cdot \frac{\varrho}{\varrho - 1} = 3 \cdot \frac{\varrho}{\varrho - 1}\right]$
1	∞
3	4,5
5	3,8
10	3,3
40	3,07

d. h. bei 10facher Kompensation der Atmung wäre Gl. [2] bereits zu 90% und bei 40facher Kompensation zu 98% erfüllt.

Nun bleibt allerdings in Wirklichkeit der Quantenbedarf der Photosynthese bei steigenden Lichtintensitäten nicht konstant, sondern er nimmt langsam zu. Aber durch geeignete biologische und physikalische Maßnahmen kann man es erreichen, daß der Quantenbedarf mit der Intensität so langsam zunimmt, daß man bei 40facher Kompensation der Atmung noch gute Ausbeuten erhält.

Zu unseren biologischen Maßnahmen gehörte die Züchtung von Zellen sehr hoher photosynthetischer Kapazität. Solche Zellen entwickelten pro Stunde bis zu ihrem 60fachen Volumen an Sauerstoff, während sie im Dunkeln in der gleichen Zeit im Mittel nur etwa das 1fache Zellvolumen an Sauerstoff verbrauchten.

Linearität der Lichtwirkungen bis zu höheren Lichtintensitäten wurde erreicht durch Verwendung sehr dünner Zellsuspensionen und durch fast vollständige Ausleuchtung dieser dünnen Suspensionen in den Manometergefäßen, so daß die Lichtintensität, zum mindesten im Grün, bei den Messungen fast homogen war. Langandauernde, durch keine Atmungsmessung unterbrochene, kontinuierliche Belichtung aber wurde durch das Prinzip der Methode ermöglicht: Durch die Nichtberücksichtigung der Atmung.

In den Abb. 1 und 2 sind zwei Versuche graphisch dargestellt. In dem Versuch der Abb. 1, bei dem mit der Wellenlänge 546 mμ $4^1/_2$ Stunden ununterbrochen belichtet wurde und die Atmung 41fach kompensiert war, betrug der Quantenbedarf des Gewinns $1/\varphi = 4{,}3$. In dem Versuch der Abb. 2, bei dem mit der Wellenlänge 644 mμ 7 Stunden ununterbrochen belichtet wurde und die Atmung 7fach kompensiert war, betrug der Quantenbedarf des Gewinns $1/\varphi = 4{,}6$. 5 Versuche mit allen experimentellen Einzelheiten sind in den Protokollen am Schluß dieser Arbeit mitgeteilt.

Im ganzen möchten wir aus unsern neuen Versuchen den Schluß ziehen, daß der Quantenbedarf der Photosynthese unter 4, wahrscheinlich unter 3 liegt. Zwischen den guten Ausbeuten aber findet man immer wieder schlechte Ausbeuten, gerade so wie bei den älteren Versuchsanordnungen. Zellen zu züchten, die das Licht *immer* maximal ausnutzen, ist ein Problem, dessen Lösung wir zur Zeit versuchen.

Daß bei 40facher Kompensation der Atmung der Sauerstoff mit einem Quantenbedarf von wenig über 4 entwickelt werden kann, ist ein Ergebnis, das man vor

wenigen Jahren noch für unmöglich gehalten hätte; das mehr als alles andere den Fortschritt auf dem Gebiet der Energetik der Photosynthese zeigt; und das die letzten Einwände gegen die hohen Ausbeuten bei der Photosynthese widerlegt. Wenn unsre Chlorella im Licht in einigen Stunden ein ihrem Trockengewicht gleiches Gewicht an Sauerstoff entwickelt, so kann sich — aus gravimetrischen Gründen — weder die Substanz noch die Energie der Chlorella *in der Bilanz* an

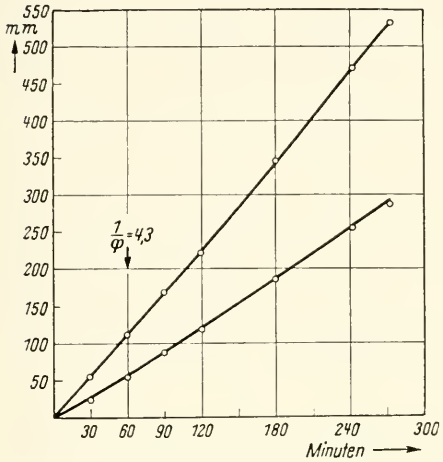


Abb. 1. Entwicklung positiver Drucke im Grün aus 8 mm³ Zellen. Kompensationsgrad 41. Quantenbedarf des O_2-Gewinns $1/\varphi = 4{,}3$. (Daten in Abschn. 16, Protokolle, Versuch II.)

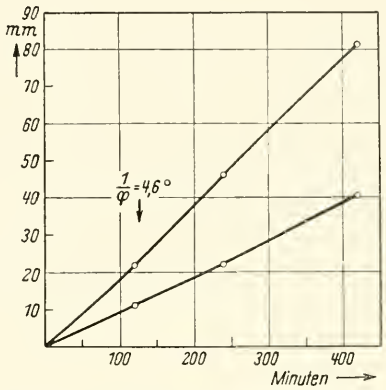


Abb. 2. Entwicklung positiver Drucke im Rot aus 5 mm³ Zellen. Kompensationsgrad 7,1. Quantenbedarf des O_2-Gewinns $1/\varphi = 4{,}6$. (Daten in Abschn. 16, Protokolle, Versuch IV.)

dieser Leistung beteiligen. Daß sich die Zelle am *Mechanismus* beteiligt, ist selbstverständlich, da sie ein Katalysator ist. Aber alle diese Beteiligungen müssen in der Bilanz chemisch und energetisch wieder verschwinden[1].

Im Folgenden beschreiben wir zunächst die neuen physikalischen und biologischen Methoden und begründen dann, warum wir die Beseitigung der Zellatmung aus den Berechnungen der Photosynthese für wünschenswert halten.

1. Die Xenon-Hochdrucklampe

Zu den bisher benutzten Lichtquellen — den Quecksilber-Hochdrucklampen mit oder ohne Cadmiumzusatz der Osram-Studiengesellschaft in Berlin — haben wir die von der gleichen Gesellschaft neuerdings entwickelte Xenon-Hochdrucklampe hinzugefügt, die für Leistungen von 160, 300 und 1000 Watt geliefert wird. Auch diese Lichtquelle ist „punktförmig". Sie strahlt ein Kontinuum aus, dessen Maximum im Himmelblau liegt und hat uns im Winter bei der Züchtung der Chlorella, als Ersatz für Tageslicht, gute Dienste geleistet.

Wir haben die Xenonlampe ferner benutzt zur Gewinnung von Spektralbezirken, die als Linien der Hg-Cd-Lampen nicht zur Verfügung stehen, z. B. zur Gewinnung von langwelligem Rot. Wir isolierten die gewünschten Bezirke mit Hilfe

von 2 hintereinander geschalteten Interferenzscheiben gleicher spektraler Durchlässigkeit, eine Methode, die der Zerlegung mit Monochromatoren überlegen ist, wenn es auf die Gewinnung größerer Intensitäten ankommt.

Zu den früheren Vorschriften der Isolierung von Linien aus der Quecksilberhochdrucklampe ist zu bemerken, daß diese Vorschriften nicht gelten, wenn dem Quecksilber Cadmium zugesetzt ist, da dann die Linien 480, 513 und 644 mμ in der Strahlung hinzukommen. In diesem Fall benutzen wir im wesentlichen Interferenzscheiben, von deren Güte es abhängt, ob wir mit *einer* Scheibe auskommen. Nur die Linie 546 mμ isolieren wir auch aus der Cd-Hg-Lampe mit Filtern, und zwar mit 2 cm 20proz. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (zur Abtrennung von 644 mμ) + 2 mm Orangeglas Nr. 4 von Schott (zur Abtrennung des Blau einschließlich 513 mμ) + 10 mm Didymglas Schott (zur Abtrennung von 578 mμ).

Im ganzen ist es aus Intensitätsgründen zu empfehlen, die Cd-Hg-Lampe nur zu benutzen, wenn die Wellenlängen 480 oder 513 oder 644 mμ benötigt werden, im übrigen aber bei der optisch einfacheren Quecksilberlampe zu bleiben. Aus einer Quecksilberhochdrucklampe von 500 Watt Leistung erhalten wir mit Filtern einen parallelen Strahl der Wellenlänge 546 mμ von der Gesamtintensität 500 mm^3 Quanten pro Minute = 22,4 Mikromole Quanten pro Minute, das ist eine Intensität, mit der man große photochemische Reaktionsgeschwindigkeiten erzielen kann. Mit einer Interferenzscheibe würden wir diese hohe Intensität nicht aus der Hg-Lampe erhalten und erst recht nicht aus der Cd-Hg-Lampe, bei der sich die Leistung auf mehr Linien verteilt.

2. Bolometrie

Während wir früher die Intensität des in die Meßgefäße eingestrahlten Lichts *vor* dem Thermostaten gemessen haben und daraus die Intensität des Lichts beim Eintritt in die Meßgefäße durch Multiplikation mit der „Durchlässigkeit" des Thermostatenwegs D berechnet haben, bestimmen wir nunmehr, wegen der wechselnden Reinheit des Thermostaten-Wassers und seiner Scheiben und Spiegel, die Lichtintensität $\mathcal{J}$ in jedem Versuch bei Austritt des Lichtstrahls aus dem Thermostaten, wo wir den vertikalen Strahl durch einen in Luft befindlichen 45°-Spiegel wieder in horizontale Richtung bringen und dann mit einer Linse auf das Bolometer konzentrieren. Die „Durchlässigkeit" D des Systems Spiegel + Linse, die als konstant zu betrachten ist, wird für jede Wellenlänge ermittelt. $\mathcal{J}/D$ ist dann die Lichtintensität beim Eintritt in die Zellsuspension. D fanden wir für:

mμ	
436	0,62
546	0,745
644	0,78

Hierbei wird der Reflexionsverlust des aus dem Thermostaten austretenden Lichtstrahls an der Grenzfläche Wasser—Luft nicht berücksichtigt, da angenommen wird, daß er gleich ist den beiden Reflexionsverlusten beim Eintritt des Lichtstrahls aus dem Thermostatenwasser in die Zellsuspension.

Anmerkung. Während wir immer die Gesamtintensität $\mathcal{J}$ des eingestrahlten Lichts mit dem Bolometer messen, bestimmen andere z. B. mit der Thermosäule die Flächenintensität i und gewinnen $\mathcal{J}$ durch Integration von i über den Querschnitt des Strahls Q ($\mathcal{J} = \int i \, dQ$). Wegen der Inhomogenität von i im Querschnitt schätzen wir den möglichen Fehler bei dem letzteren Verfahren auf 50%.

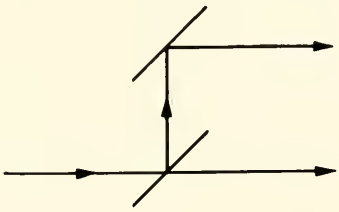
3. Der bewegliche Spiegel

Während früher die 45°-Spiegel, die im Thermostaten das Licht senkrecht nach oben in die Manometergefäße reflektieren, fest montiert waren, wurden sie nunmehr an den Manometern befestigt und bewegten sich synchron mit den Manometern in horizontaler Richtung.

Weiterhin war der Querschnitt des Lichtstrahls beim Eintritt in die Manometergefäße nicht mehr rund, sondern hatte die Form und die Größe der Grundflächen der rechteckigen Kästchen. Durch beide Maßnahmen, die beweglichen Spiegel und die Form des Lichtstrahls, wurde erreicht, daß die Zellsuspension bei den manometrischen Versuchen fast vollständig ausgeleuchtet wurde, während sie früher nur zu etwa $^1/_7$ ausgeleuchtet wurde. Bei gleicher Gesamtintensität $\mathcal{J}$ war also nunmehr die Flächenintensität i wesentlich kleiner, wodurch Linearität der Lichtwirkungen bis zu höheren Lichtstärken erreicht wurde.

4. Der teildurchlässige Spiegel

Während früher bei der 2-Gefäß-Methode der Lichtstrahl mit 4 total reflektierenden Prismen zweigeteilt wurde, benutzen wir nunmehr zur Teilung des Lichtstrahls einen teildurchlässigen Spiegel, der einen Teil des Lichtstrahls durchläßt, während er den andern Teil auf einen zweiten gewöhnlichen Silberspiegel reflektiert:



Beide Strahlen wurden mit Irisblenden und Bolometer auf gleiche Intensitäten justiert.

Die neue Anordnung hat den Vorteil, daß die Verteilung des Lichts auf die beiden Strahlen sich weniger ändert, wenn der Lichtbogen „springt"; sie hat den geringeren Nachteil, daß man jedesmal neu justieren muß, wenn man die Wellenlänge ändert, da der Grad der Teildurchlässigkeit der Spiegel von der Wellenlänge abhängt.*

---

* *Zusatz 1961.* Es folgt daraus, daß man mit dem teildurchlässigen Spiegel nur teilen darf, wenn das Licht monochromatisch ist, während mit den 4 Prismen auch weißes Licht geteilt werden kann.

5. Aktinometer

Wir haben das Volumen des Aktinometers weiter vergrößert. Das Gesamtvolumen ist nunmehr 184 cm^3, das Flüssigkeitsvolumen 120 cm^3, der Gasraum also 64 cm^3. Die eingefüllten Substanzen waren:

Pyridin reinst Merck mit 0,40 mg/cm^3 Phaeophorbid (a + b) und 30 mg/cm^3 Thioharnstoff. Bei 20^0 und mit α des Pyridins = 0,092 war die Gefäßkonstante des Aktinometers 7,08 mm^2.

Neu eingebaut in das Aktinometer waren an der oberen Innenfläche zwei Quarzleisten, die verhinderten, daß bei schnellem Schütteln Flüssigkeit in die Kapillare einspritzte. Wegen der vermehrten Flüssigkeitsmenge war nunmehr auch bei sehr schnellem Schütteln die Lichtabsorption in dem Aktinometer vollständig. Zum Schutz gegen diffuses Licht war das Aktinometer in Metallfolie eingebaut. Als Thermobarometer diente ein gleich großes, mit reinem Lösungsmittel beschicktes Aktinometer. Es ist bemerkenswert, daß auch bei Verwendung der erhöhten Mengen von Flüssigkeit und Reagentien keine Dunkelreaktionen bemerkbar wurden.

Bei den Transmissionsbestimmungen enthielt der Gasraum Luft. Die Linearität wurde nicht nur mit Rauchgläsern geprüft, sondern auch mit „weißen" Zellsuspensionen, wobei für Wasser und die weißen Zellen die gleichen Transmissionen gefunden wurden, wenn von den grünen Zellen bis zu 50% des eingestrahlten Lichts transmittiert wurde. Die Verteilung des Lichts auf größere Flächen infolge der Zerstreuung bedingte also bei den angewandten Zelldichten keine Fehler.

Bei den Bestimmungen der Quantenintensität enthielt der Gasraum reinen Sauerstoff. Wir erhielten dann $\varphi = 1$ für die Wellenlängen 436, 480, 546, 578 und 644 $m\mu$ bis zu eingestrahlten Quantenintensitäten von 15 mm^3 pro Minute, während bei Verwendung des kleinen Aktinometers ($v_F = 7$) nur 1,5 mm^3 Quanten eingestrahlt werden durften, wenn man $\varphi = 1$ erhalten wollte. Durch die Vergrößerung der Abmessungen des Instruments ist also die erlaubte Intensitätsgrenze auf das 10fache gesteigert worden.

Als Instrument zur Messung der Durchlässigkeit von Zellsuspensionen wird das Aktinometer von der ULBRICHTschen Kugel verdrängt werden, weil die Kugel schneller arbeitet, während das Aktinometer seine Bedeutung bei der Messung von Quantenintensitäten behalten wird. Denn anders als das Bolometer mißt das Aktinometer die Zahl der Quanten. Nicht mit dem Bolometer, aber mit dem Aktinometer kann man die Quantenintensität von polychromatischem Licht messen, ohne die spektrale Zusammensetzung des Lichts zu kennen. Und ferner: Das Aktinometer mißt $\int J\, dt$, das Bolometer aber nur $\mathcal{J}$.

6. Argon

Da Sauerstoff und Stickstoff, wenn sie unter Druck in Stahlflaschen aufbewahrt werden, Spuren von Stickoxyden bilden können, die giftig sind, so haben wir, wie bereits früher bei Stoffwechselversuchen mit tierischen Zellen, nunmehr auch bei den Versuchen mit Chlorella den Stickstoff durch Argon ersetzt, und zwar sowohl bei der Züchtung als auch bei den manometrischen Messungen.

7. Züchtung und Eigenschaften der Zellen

Zur Zucht der *Chlorella pyrenoidosa*, deren Stamm wir Professor HARDER, Göttingen, verdanken, verwenden wir nicht mehr Brunnenwasser, sondern aus Quarz dest. Wasser, dem wir alle von ARNON[1] empfohlenen Mikroelemente zusetzen. Die Lichtquelle war immer das Tageslicht, dem als kontinuierliche Lichtquelle eine 200-Watt-Metallfadenlampe oder eine 160-Watt-Xenon-Hochdrucklampe hinzugefügt wurde. Die Saat war 30—60 mm^3 pro 250 cm^3 Kolben, die Ernte nach 1—2 Tagen 200—600 mm^3 Zellen. War die Ernte nicht größer als 200 mm^3 Zellen, so konnte die Kultursuspension direkt zur Messung der Photosynthese benutzt werden. War die Ernte größer, so mußten die Zellen in neue Kulturlösung übertragen werden. pH bei Beginn der Kultur war immer etwa 4,2 und stieg bis zur Ernte auf 5—5,5.

Die so gezüchteten Zellen unterscheiden sich in mancher Hinsicht von unsern früheren Zellen, z. B.:

1. Die neuen Zellen haben eine höhere photochemische Kapazität.

2. Die neuen Zellen sind osmotisch empfindlicher. Werden sie aus ihrer Kulturlösung in dest. Wasser übertragen, so koagulieren sie.

3. Die Rückreaktion der neuen Zellen, wenn sie in Kulturlösung suspendiert und mit 10% CO_2 gesättigt sind, hat eine Halbwertszeit von nur einigen Sekunden (vgl. Abschn. 13).

4. Die neuen Zellen verhalten sich gegen Änderungen des CO_2-Drucks — in sauren wie in alkalischen Medien — anders als die alten Zellen, worüber eine Arbeit folgt.

Es ist hervorzuheben, daß die aufgezählten Verschiedenheiten nicht von Verschiedenheiten der verwendeten Chlorella-Stämme herrühren. Der einzig erkennbare morphologische Unterschied war, daß über Zentrifugaten der alten Zellen breite weiße Säume (über den grünen Zellen) gesehen wurden, die aus Sporenhüllen bestanden; während über Zentrifugaten der neuen Zellen keine weißen Säume oder nur sehr dünne Säume gesehen wurden.

Literatur

1 ARNON, D. J., Amer. J. Bot. 25 (1938), 322.

19 Über die Wirkungsgruppen der oxydierenden und reduzierenden Fermente*

Von Otto Warburg, Berlin-Dahlem

Vortrag, gehalten bei der Hauptversammlung der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin-Dahlem am 21. Mai 1953.

Seit Lavoisier im Jahre 1780 die Zellatmung entdeckte, hat man sich fragen müssen, wie es kommt, daß die biologischen Brennstoffe im Leben mit Sauerstoff reagieren, während sie im Reagenzglas mit Sauerstoff nicht reagieren. Die Antwort lautet: So wenig wie im Reagenzglas, so wenig reagieren die Brennstoffe im Leben mit Sauerstoff; sondern der Sauerstoff reagiert im Leben mit komplexem Ferro-Eisen, das er zu Ferri-Eisen oxydiert. Ist dies geschehen, so wird das Ferri-Eisen von der Zelle zurückreduziert, und neuer Sauerstoff kann mit dem Ferro-Eisen reagieren. Der so wirkende Katalysator der Atmung, den man das sauerstoffübertragende Eisen genannt hat, ist durch eine ungewöhnliche Methode entdeckt worden, deren Prinzip ich durch einen Versuch erläutern will.

Versuch I

Das Spektrum einer Xenon-Hochdrucklampe der Osram-Studiengesellschaft wird auf eine Perlwand projiziert. In den Strahlengang bringt man zwei Tröge, die beide eine Lösung von reduziertem Bluthämin in 15% Pyridin-Wasser enthalten. Beide Lösungen unterscheiden sich dadurch, daß die obere mit Stickstoff, die untere mit Kohlenoxyd gesättigt ist. Oben, in Stickstoff, sieht man die Banden des freien, nicht mit Kohlenoxyd verbundenen Eisens, die im grün liegen. Unten, in Kohlenoxyd, sollte man die Banden des mit Kohlenoxyd verbundenen Eisens sehen, die im gelb liegen. Doch ist das nicht der Fall, da das starke Licht der Projektionslampe die Kohlenoxydverbindung, sowie sie sich bildet, immer wieder spaltet. Zunächst also sieht man keinen Unterschied in der Lage der Banden in den beiden Trögen.

Schwächt man jedoch das Licht der Projektionslampe, bevor es in die Tröge eintritt, mit einem Rauchglas, so sieht man, wie in dem unteren Trog die Banden von grün nach gelb wandern; während sie von gelb nach grün zurückkehren, wenn man das Rauchglas wieder fortnimmt. Sehr schön sieht man die Erscheinungen, wenn man durch einen rotierenden Sektor das Licht abwechselnd stärker und schwächer werden läßt. Dann bleiben die Banden in dem oberen Trog, wo kein Kohlenoxyd ist, ruhig, während sie sich in dem unteren Trog, wo das Kohlenoxyd ist, hin- und herbewegen. So also kann man sehen, wie das Kohlenoxyd im Dunkeln (oder in schwachem Licht) mit Eisen reagiert und wie es im Licht von dem Eisen wieder abgespalten wird.

Anwendung. Wir fanden, daß Kohlenoxyd im Dunkeln die Zellatmung hemmt und daß Licht die Kohlenoxydhemmung der Atmung wieder zum Verschwinden

* Aus Die Naturwissenschaften 40 (1953): 493.

bringt, mit anderen Worten: Wir fanden, daß Kohlenoxyd im Dunkeln mit einem Katalysator der Atmung reagiert und daß es im Licht von diesem Katalysator wieder abgespalten wird. Diese Analogie war so groß, daß man sagen kann, Kohlenoxyd und Licht haben das sauerstoffübertragende Eisen entdeckt, damals eine unsichtbare Substanz, die aus den Zellen zu isolieren aussichtslos erschien.

Isolierung des sauerstoffübertragenden Eisens. Obwohl mit Kohlenoxyd und Licht viele Eigenschaften des sauerstoffübertragenden Eisens gefunden wurden, so hatte die Methode doch ihre Begrenzungen, und so haben wir im Laufe der Jahre immer wieder versucht, das sauerstoffübertragende Eisen zu isolieren. In einer Arbeit mit NEGELEIN wurde der Anfang gemacht; aber erst in einer Arbeit mit HANS-SIEGFRIED GEWITZ ist es in der letzten Zeit gelungen, das sauerstoffübertragende Eisen in solchen Mengen zu isolieren und zu kristallisieren, daß man heute diese wichtige Substanz mit den Methoden der Chemie untersuchen kann. Dabei hat das isolierte Eisen bestätigt, was Kohlenoxyd und Licht vorausgesagt hatten: daß das sauerstoffübertragende Eisen eine Häminverbindung ist; daß die Kohlenoxydbande des sauerstoffübertragenden Eisens um 590 mμ liegt; daß das sauerstoffübertragende Eisen wesentlich verschieden von Bluthämin ist.

Versuch II

Auf der Perlwand wird ein Trog abgebildet, der eine Lösung des sauerstoffübertragenden Hämins in 3% Pyridin enthält. Das Eisen des Hämins ist hier 3wertig, die Farbe der Lösung ist gelbgrün. Reduzieren wir nunmehr das Eisen, so sieht man, wie beim Valenzwechsel des Eisens die Farbe der Lösung von gelbgrün in tiefes Rot umschlägt. Leiten wir dann Sauerstoff durch die rote Lösung, so wird das 2wertige Eisen wieder zu 3wertigem Eisen oxydiert, und die Lösung wird wieder gelbgrün.

Dies ist insofern kein Modellversuch, als es der Valenzwechsel desselben Hämins ist, der sich fortgesetzt in allen unsern Zellen abspielt. Es ist der Vorgang, durch den im wesentlichen der Sauerstoff in der organischen Welt übertragen wird.

Versuch III

Wiederum wird das Spektrum der Xenon-Hochdrucklampe projiziert. In den Strahlengang werden zwei Tröge gebracht, von denen der obere Trog eine Lösung von Bluthämin enthält, der untere Trog eine Lösung des sauerstoffübertragenden Hämins. In beiden Trögen ist das Eisen zunächst 3wertig. Reduzieren wir das Eisen in beiden Trögen zur Ferro-Form, so entwickeln sich in beiden Trögen die Ferrobanden. Sie sind sehr erheblich gegeneinander verschoben. Die Banden des Bluthämins liegen im grün, die Banden des sauerstoffübertragenden Hämins aber im gelb.

In entsprechender Weise vergleichen wir das Spektrum des sauerstoffübertragenden Hämins mit einem Hämin, das wir aus Chlorophyll b, nach Abspaltung des Magnesiums durch Eisen, gewonnen haben. Hierbei zeigt sich, daß die Ferrobanden der beiden Hämine *nicht* wesentlich gegeneinander verschoben sind. Spektral

steht also das sauerstoffübertragende Hämin dem Hämin aus Chlorophyll b näher als dem Bluthämin.

Chemische Konstitution. Der durch die Absorptionsbanden gefundene Unterschied zwischen sauerstoffübertragendem Hämin und Bluthämin kommt in den Elementaranalysen sehr deutlich zum Ausdruck. Bluthämin enthält 8,5% Stickstoff, sauerstoffübertragendes Hämin enthält nur 6,5% Stickstoff. Bluthämin enthält 34 Atome Kohlenstoff, sauerstoffübertragendes Hämin enthält etwa 48 Atome Kohlenstoff. In der Tat enthält das sauerstoffübertragende

Fig. 1. Dimethylester des Deuteroporphyrins aus sauerstoffübertragendem Hämin.

Fig. 2. Dimethylester des Deuterohämins aus sauerstoffübertragendem Hämin.

Hämin eine Kette von Kohlenstoffatomen, die bisher noch in keinem Hämin gefunden worden ist und von der die besonderen physikalischen Eigenschaften des sauerstoffübertragenden Hämins, z. B. seine Löslichkeit in Äther, herrühren. In den Pyrrolringen 1 oder 2 befindet sich ferner eine Formylgruppe, die sonst für das Chlorophyll b charakteristisch ist; während die Pyrrolringe 3 und 4, die die beiden Propionsäuren tragen, identisch sind mit den entsprechenden Pyrrolringen des Bluthämins. Das sauerstoffübertragende Hämin ist also in der einen Hälfte Bluthämin, in der anderen Hälfte steht es dem Chlorophyll nahe und enthält außerdem eine Kohlenwasserstoffkette, die in keinem der beiden anderen Hämine vorkommt. Einige besonders schön kristallisierende Derivate des sauerstoffübertragenden Hämins sind in den Fig. 1 und 2 abgebildet.

Im Leben ist das sauerstoffübertragende Hämin, wie mit Kohlenoxyd und Licht gefunden wurde, an Eiweiß gebunden. Diese Bindung des Hämins an Eiweiß beeinflußt sowohl die Energie als auch die Geschwindigkeit des Valenzwechsels. Mit der Wirkungsgruppe — dem Eisen- und dem Wirkungsmechanismus —, dem Valenzwechsel —, ist also die Katalyse noch nicht vollständig erklärt. Aber im

Vergleich zu dem Zustand, in dem man weder Wirkungsgruppe noch Wirkungsmechanismus kannte, ist der Fortschritt fast unendlich groß.

Nikotinsäureamid. Eine andere Wirkungsgruppe, die wir bei der Untersuchung der Zellatmung gefunden haben, ist das Nikotinsäureamid. Es ist eine einfache Pyridinverbindung, die durch partielle Hydrierung und Dehydrierung ihres Pyridinrings in der Atmung Wasserstoff überträgt (Fig. 3).

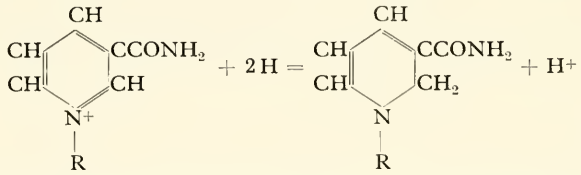


Fig. 3. Wasserstoff- (Elektronen-) Aufnahme durch Nikotinsäureamid.

Versuch IV

Auch die Funktion des Nikotinsäureamids kann man durch ein Experiment zeigen. Zwar ist das Nikotinsäureamid eine farblose Substanz, die auch im Ultraviolett keine charakteristischen Banden hat. Aber wenn das Nikotinsäureamid Wasserstoff aufnimmt, so entsteht im nahen Ultraviolett eine charakteristische Bande und mit der Bande eine bläulich-weiße Fluoreszenz. Man kann also die Wasserstoffaufnahme des Nikotinsäureamids zeigen, wenn man es vor dem Schwarzglas einer Analysen-Quarzlampe reagieren läßt. Zum Beispiel befindet sich in der einen Flasche eine Nikotinsäureamid-Verbindung, in der andern ein Reduktionsmittel. Jede der beiden Lösungen ist vor dem Schwarzglas dunkel. Gießen wir aber die beiden Lösungen zusammen, so entsteht das partiell hydrierte Nikotinsäureamid, und mit ihm erscheint die bläulich-weiße Fluoreszenz.

Diese Fluoreszenz entsteht immer, wenn Nikotinsäureamid und die Brennstoffe der Zelle unter geeigneten Bedingungen zusammentreffen. Dann entzieht das Nikotinsäureamid den Brennstoffen Elektronen und verbrennt sie, schrittweise, zu Kohlensäure und Wasser.

Nikotinsäureamid ist auch der Wasserstoffüberträger der Gärungen. Bei den Gärungen entzieht das Nikotinsäureamid dem *einen* Teil des Zuckers Wasserstoff und überträgt diesen Wasserstoff auf den *anderen* Teil des Zuckers. Wenn z. B. bei der alkoholischen Gärung der Zucker zum Teil zu Kohlensäure oxydiert, zum Teil zu Alkohol reduziert wird, so ist dies das Werk des Nikotinsäureamids. Die Gleichung der Alkoholbildung lautet:

Dihydro-Nikotinsäureamid + Acetaldehyd = Nikotinsäureamid + *Alkohol.*

Diese Reaktion ist es, durch die der Alkohol in der lebenden Natur entsteht.

Auch bei der Photosynthese scheint das Nikotinsäureamid eine Rolle zu spielen. Es wird neuerdings von Severo Ochoa angenommen, daß in grünen belichteten Pflanzenzellen Nikotinsäureamid den Wasserstoff des Wassers aufnimmt und mit diesem Wasserstoff die Kohlensäure reduziert,* während der Sauerstoff des Wassers in die Luft entwickelt wird.

* *Zusatz 1961.* Dies stimmt heute nicht mehr.

Die Wasserstoffübertragung durch Nikotinsäureamid wurde 1934 in Dahlem entdeckt. Seitdem hat diese Substanz ihren Siegeszug durch die Biochemie angetreten, der noch heute mit unverminderter Stärke anhält. In der Bilanz ist der Sauerstoff das Oxydans der organischen Welt; aber dem Mechanismus nach ist es das Nikotinsäureamid. In der Bilanz sind die Gärungen Dismutationen der Substrate; aber dem Mechanismus nach sind sie Wasserstoffverschiebungen durch Nikotinsäureamid. In der Bilanz ist die Photosynthese eine Spaltung von Kohlensäure in Kohlenhydrat und Sauerstoff; aber dem Mechanismus nach ist sie vielleicht eine Wasserstoffübertragung durch Nikotinsäureamid.

Alloxazin. Eine dritte Wirkungsgruppe, die wir bei der Untersuchung der Zellatmung gefunden haben, ist das gelbe Alloxazin, ein einfacher stickstoffhaltiger Ring, dessen Funktion es ist, den Wasserstoff, den das Nikotinsäureamid den Brennstoffen entzogen hat, an das Eisen weiterzugeben. Alloxazin und seine in der Natur vorkommenden Derivate sind von RICHARD KUHN in berühmten Arbeiten synthetisiert worden.

Versuch V.

Alloxazin fluoresziert bei Bestrahlung mit blauem Licht gelbgrün, während das reduzierte Alloxazin farblos ist und auch im nahen Ultraviolett nicht fluoresziert. Läßt man also das gelbe Alloxyzin in blauem Licht oder vor dem Schwarzglas der Analysen-Quarzlampe zwei Atome Wasserstoff aufnehmen, so verschwindet die Fluoreszenz. Leitet man Sauerstoff durch die Lösung, so kehrt die Fluoreszenz zurück.

Kette der Wirkungsgruppen. Weitere Wirkungsgruppen der Atmung sind die drei Hämine, die MACMUNN im Jahre 1885 entdeckte und die er Histohämatine genannt hat. Es sind drei Eisenverbindungen, deren Ferroformen nicht mit Sauerstoff reagieren und deren Wirkungsweise deshalb lange Zeit unverständlich blieb. Heute wissen wir, daß die Histohämatine mit den anderen Wirkungsgruppen der Atmung in einer Kette zusammenwirken und daß ihr Platz zwischen Alloxazin und sauerstoffübertragendem Eisen ist. Damit ist die Zahl unserer Wirkungsgruppen auf sechs gestiegen, und wahrscheinlich sind damit alle Wirkungsgruppen der biologischen Verbrennung erkannt.

Der vollständige Mechanismus der biologischen Oxydation läßt sich dann in wenigen Sätzen zusammenfassen: Das Nikotinsäureamid entzieht den Brennstoffen Elektronen, wodurch sie oxydiert werden. Es folgt der Transport dieser Elektronen von dem Nikotinsäureamid zu dem Alloxazin, von dem Alloxazin zu den Histohämatinen, von den Histohämatinen zu dem sauerstoffübertragenden Eisen, von dem sauerstoffübertragenden Eisen zu dem molekularen Sauerstoff. Der eigentliche und innerste Mechanismus der Verbrennung in dieser 6stufigen Kette ist der Übergang der Elektronen von den Brennstoffen auf das Nikotinsäureamid. Alles weitere ist Abtransport dieser Elektronen zum molekularen Sauerstoff.

Von keinem Glied der Kette kann man sagen, daß es wichtiger sei als das andre. Fällt *ein* Glied aus, so kommt die Zellatmung zum Stillstand. Zum Beispiel beruht

die giftige Wirkung der Blausäure darauf, daß sie sich mit dem sauerstoffübertragenden Eisen verbindet. Dann ist dieses Eisen nicht mehr imstande, Elektronen auf den molekularen Sauerstoff zu übertragen; es stauen sich die Elektronen am Nikotinsäureamid, und damit kommt der ganze Prozeß der Atmung zum Stillstand.

Nukleotide. Es bleibt noch, die Bindung der Wirkungsgruppen Nikotinsäureamid und Alloxazin in den Katalysatoren zu erläutern. Wie das Eisen nicht als freies Ion

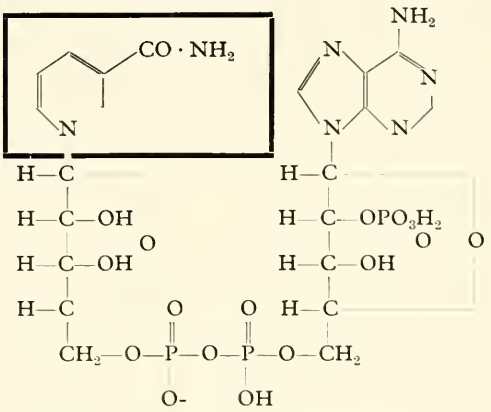


Fig. 4. Triphospho-Pyridin-Nukleotid.

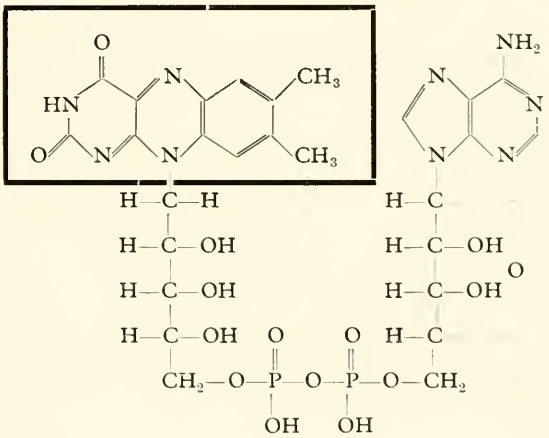


Fig. 5. Alloxazin-Adenin-Dinukleotid.

vorliegt, sondern eingebaut in Porphyrine, so liegen Nikotinsäureamid und Alloxazin nicht als freie Basen vor, sondern eingebaut in Molekeln, die Phosphorsäure, Kohlenhydrat und meistens auch Adenin enthalten und die Nukleotide genannt worden sind. Aus den Fig. 4 und 5 sieht man, daß in solchen Nukleotiden die (umrandeten) Wirkungsgruppen nur einen kleinen Teil der Molekeln ausmachen.

Bindung an Eiweiß. Die Nukleotide sind in den Katalysatoren nicht frei, sondern sie sind, ebenso wie die Hämine, an Eiweißkörper gebunden, deren Molekular-

gewicht von der Größenordnung 100 000 ist. Damit bin ich in meiner Darstellung von den Wirkungsgruppen bis zu den sauerstoff- und wasserstoffübertragenden Fermenten vorgedrungen, die also nach dem Gesagten drei Komponenten enthalten. Ihre Größenverhältnisse soll die Fig. 6 veranschaulichen. Der große Kreis ist das Eiweiß. Der mittlere Kreis ist das Hämin oder das Nukleotid. Der innerste Kreis ist die Wirkungsgruppe — das Eisen oder das Nikotinsäureamid oder das Alloxazin.

So ist es also bei der Untersuchung der Zellatmung gewesen, daß die Natur — zum ersten Male — das Geheimnis von Fermentwirkungen preisgegeben hat. Dabei hat sich gezeigt, daß diese Fermente *nicht*, wie noch WILLSTAETTER glaubte, durch besondere, nur dem Leben eigene Kräfte wirken; sondern die sauerstoff- und wasserstoffübertragenden Fermente wirken durch chemische Zwischenreak-

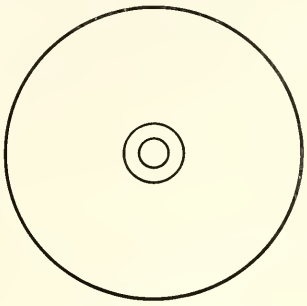


Fig. 6. Größenverhältnisse der 3 Komponenten der sauerstoff- und wasserstoffübertragenden Fermente.

tionen einfacher, längst bekannter Substanzen, deren Besonderheit es lediglich ist, daß die Zwischenreaktionen schneller verlaufen, als die organische Chemie es für möglich gehalten hätte.

Hugo Theorell. Untrennbar mit diesen Ergebnissen verbunden ist ein Name, dessen Träger zu unserer Freude unter uns weilt. Ich meine HUGO THEORELL. Als THEORELL 1933 nach Dahlem kam, war das gelbe Ferment noch mehr als unrein, und von den Alloxazinen war nur das Luminoflavin entdeckt. THEORELL stellte das gelbe Ferment rein dar. Er zerlegte das reine Ferment in Eiweiß und Alloxazin und entdeckte dabei das Alloxazin-*Nukleotid.* Und schließlich glückte es THEORELL, Eiweiß und Nukleotid wieder zu dem voll wirksamen Ferment zu vereinigen. Es ist die noch heute unübertroffene Meisterarbeit der Fermentchemie.

Anmerkungen

1. Anlaß zu diesem Vortrag war der Fortschritt in der Chemie des sauerstoffübertragenden Eisens und — noch mehr — der Wunsch, ein Gebiet, auf dem Physik und Chemie am weitesten in das Gebiet der Lebensvorgänge hineinragen, auch in der Sprache dieser Wissenschaften darzustellen. Wir sagen also nicht mehr, daß „Kodehydrasen Reaktionen aktivieren", wenn wir wissen, daß Wasserstoffübertragungen durch Nikotinsäureamid vorliegen. Wir sagen nicht mehr, daß „Cytochrom a'_3 den molekularen Sauerstoff aktiviert", wenn wir wissen, daß Reaktionen des Sauerstoffs mit Ferro-Eisen vorliegen. Wir sagen nicht mehr, daß „Gärungsfermente die Dismutation von Substraten aktivieren", wenn wir wissen, daß Was-

serstoffverschiebungen durch Nikotinsäureamid vorliegen. Erst so werden wir die biologische Verbrennung in ihrer großartigen Einfachheit verstehen und sie anderen klar machen können.

2. Wenn wir dem Ferro-Eisen den Preis als biologischen Reaktionspartner des molekularen Sauerstoffs zuerkennen, so vergessen wir dabei doch nicht das sauerstoffübertragende Kupfer, das wir 1937 entdeckt haben, das aber als biologischer Reaktionspartner des Sauerstoffs gegenüber dem Eisen zu vernachlässigen ist. — Wir vergessen auch nicht die gelben Fermente, die in manchen Anaerobiern ohne vorgeschaltetes Eisen vorkommen und dann direkt mit molekularem Sauerstoff reagieren können. Aber diese Anaerobier — dereinst die Vorkämpfer im Kampf gegen das sauerstoffübertragende Eisen — beteiligen sich per definitionem nicht wesentlich an dem Sauerstoffverbrauch der lebenden Natur.

3. In dem ersten Pyridin-Proteid, das wir kristallisiert haben — in dem reduzierenden Gärungsferment der Hefe — fanden wir, daß das Protein das Nikotinsäureamid hydrieren kann, das heißt wahrscheinlich, daß die SH-Gruppen des Proteins das Nikotinsäureamid hydrieren können. (Biochem. Z. 293, 351 [1937].) Aber die Hydrierung des Nikotinsäureamids durch das Protein verläuft eine Million mal langsamer als die Hydrierung des Nikotinsäureamids durch den Alkohol im Verband des Proteins. Es ist also ausgeschlossen, daß die Hydrierung des Nikotinsäureamids durch den Alkohol über die SH- oder irgendwelche andere Gruppen des Proteins geschieht.

4. Es ist wahr, daß die zusammengefaßten Wirkungen der sauerstoff- und wasserstoffübertragenden Fermente nicht der Zellatmung gleichgesetzt werden dürfen. Denn zur Zellatmung gehören auch die Phosphorylierungen; die Spaltungen und Kondensationen; der C_4-Zyklus; die Reaktionen des Koferments A; kurz der gesamte intermediäre Stoffwechsel. Aber überall da, wo eine Oxydation oder Reduktion zu vollziehen ist, erscheinen das Eisen oder das Nikotinsäureamid oder das Alloxazin, die deshalb die Wirkungsgruppen nicht der Atmungsfermente, aber der Oxydations- und Reduktionsfermente sind.

20 Über das Verhalten von Aszites-Tumorzellen zu Sauerstoff von höheren Drucken*

Von Otto Warburg

Seit bekannt ist, daß Tumorzellen und fakultative Anaerobier in ihrem Stoffwechseltypus übereinstimmen, ist diskutiert und untersucht worden, wie sich Tumorzellen zu Sauerstoff verhalten. Offenbar sind für derartige Untersuchungen Aszitestumorzellen besonders geeignet, da man hier — anders als bei Versuchen mit Gewebeschnitten — sicher ist, daß O_2-Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Umgebung herrscht. Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir Versuche über den Einfluß verschiedener Sauerstoffdrucke auf Aszitestumorzellen angestellt, über deren Ergebnisse ich im folgenden berichte.

Versuchsanordnung

Zellen des Ehrlichschen Mäuseaszitestumors, dessen Stamm wir Herrn Dr. Georg Klein, Stockholm, verdanken, wurden, wie früher beschrieben, unter Zusatz von 0,1 mg Heparin zu 1 cm^3 entnommen und weitergeimpft. Der für die Versuche verwendete Aszites war fünf- bis zehntägig und enthielt in 1 cm^3 200—350 mm^3 Zellen. Die Zwischenflüssigkeit, das „Aszitesserum", enthielt nur sehr wenig Zucker, dagegen reichlich Milchsäure, nämlich 1 bis 1,5 mg je Kubikzentimeter. Der Gehalt an Bikarbonat betrug etwa 350 mm^3 Kohlensäure. Ist der Aszites mit Sauerstoff in Berührung, so verbrennen die Zellen die Milchsäure des Serums, wobei der Bikarbonatgehalt um soviel Kubikmillimeter CO_2 zunimmt, als Kubikmillimeter Milchsäure verbrennen; denn die Zunahme an Bikarbonat fanden wir genau gleich der Abnahme der nach Avery und Hastings bestimmten Milchsäure. Setzt man Zucker zu dem Aszites, so entwickeln die Zellen, unter anaeroben Bedingungen, 40 bis 60 mm^3 Milchsäure je Milligramm und Stunde. Wegen dieser starken Gärung muß der Aszites für die Gärungsmessungen auf das 50—100fache verdünnt werden. Verdünnt man dabei mit Aszitesserum und schüttelt während der Hauptzeit der manometrischen Messungen langsam und nur vor den Ablesungen schnell, so kann die hohe Gärung viele Stunden konstant gehalten werden.

Zur Prüfung der Wirkung der Sauerstoffdrucke wurden einige Kubikzentimeter des verdünnten Aszites, der je Kubikzentimeter 0,1 mg Heparin enthielt, in ein Manometriekästchen gegeben, immer ohne Zusatz von Zucker, da andernfalls das Bikarbonat zu schnell verbraucht worden wäre. Das Kästchen wurde in einen auf 38° geheizten Druckkasten gebracht und hier offen so langsam bewegt, daß die Zellen nicht sedimentierten. In dem Druckkasten war der CO_2-Druck immer $1/_{20}$ Atm., während der Sauerstoffdruck von $1/_5$ bis auf 5 Atm. variiert wurde.

Nach 15—16 Stunden wurden die Kästchen aus dem Druckkasten herausgenommen. Zur Prüfung auf Virulenz wurde 0,2 cm^3 des behandelten Aszites auf

---

* Aus Archiv für Geschwulstforschung VI (1953): 7.

Mäuse verimpft; in einem anderen Teil wurde das Bikarbonat durch Ansäuern mit Schwefelsäure manometrisch bestimmt; in einem anderen Teil wurde die Milchsäure nach AVERY und HASTINGS bestimmt; ein anderer Teil wurde auf das 50—100fache mit Serum von nicht behandeltem Aszites verdünnt; in dem verdünnten Aszites wurde nach Zusatz von Glukose die anaerobe Milchsäurebildung manometrisch bestimmt.

Zur Virulenzprüfung ist zu bemerken, daß die Impfmenge 0,2 cm^3 Aszites je Maus immer in wenigen Tagen Aszites erzeugte, wenn der Aszites nicht vorbehandelt worden war. Spätestens in 10 Tagen mußten die Mäuse wegen Aszites getötet werden. Erzeugten 0,2 cm^3 des behandelten Materials nach 7—10 Tagen keinen Aszites, so betrachteten wir die Virulenz als vernichtet, obwohl es möglich ist, daß nach langen Zeiten doch noch Aszites aufgetreten wäre.

Ergebnisse

Sauerstoffdrucke bis zu 2 Atm., die bei 38° auf zuckerfreien, unverdünnten Aszites 16 Stunden einwirken, bringen weder die Virulenz noch den Gärungsstoffwechsel zum Verschwinden.

Beträgt unter sonst gleichen Bedingungen der Sauerstoffdruck 5 Atm., so werden Virulenz und Gärungsstoffwechsel vernichtet.

Der kritische Sauerstoffdruck scheint etwas unter 2,5 Atm. zu liegen. Im allgemeinen haben wir bei 2,5 Atm. Sauerstoff starke Schädigung des Gärungsstoffwechsels und Vernichtung der Virulenz beobachtet.

Zum Beleg sind in dem folgenden Abschnitt einige Versuche mit experimentellen Einzelheiten mitgeteilt.

Versuchsbeispiele

Versuch vom 14. 2. 1952. Aszites enthielt 250 mm^3 Zellen je Kubikzentimeter. 3 cm^3 Aszites + 0,3 mg Heparin 16 Stunden bei 38° in 5 Vol.-% CO_2-Luft, Gesamtdruck 1 Atm., bewegt.

Impftest: 2 Mäuse vorher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 6 Tagen beide wegen Aszites getötet. — 5 Mäuse nachher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 7 Tagen alle wegen Aszites getötet.

Gärungsmessung: Der Aszites wurde nach der 16 stündigen Behandlung soweit mit Asziteserum verdünnt, daß 3,05 mm^3 Zellen = 0,532 mg Trockensubstanz auf 1 cm^3 kamen.

$$38^0.\ \text{Kästchen}\ v = 4{,}603\ cm^3;\ k_{CO_2}^{Serum} = 0{,}450\ mm^2.$$

$V_F = 1\ cm^3 + 2$ mg Glukose mit 0,532 mg Zellsubstanz. Gasraum 5 Vol.% CO_2—N_2.

$$60' + 50\ mm = 22{,}5\ mm^3.$$

$$Q_M^{N_2} = \frac{22{,}5}{0{,}532} = 42.$$

Der Versuch lehrt, daß die Virulenz vollständig und die Gärung zu 85% erhalten bleiben, wenn der unverdünnte Aszites 16 Stunden bei 38° bei $^1/_5$ Atm. O_2, $^1/_{20}$ Atm. CO_2, bewegt wird.

Versuch vom 4. 2. 1952. Aszites enthielt 230 mm^3 Zellen/cm^3 · 5 cm^3 mit 0,5 mg Heparin 15 Stunden bei 38° bei O_2 Druck von 5 Atm. bewegt.

Impftest: 3 Mäuse vorher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 4 Tagen wegen Aszites getötet. 5 Mäuse nachher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 25 Tagen alle gesund.

Gärungsmessung: Der Aszites wurde nach der 15stündigen Behandlung so weit mit Asziteserum verdünnt, daß 3,02 mm^3 Zellen = 0,53 mg Trockensubstanz auf 1 cm^3 kamen.

$$38^0.\ \text{Kästchen } v = 4{,}603\ cm^3;\ k_{CO_2}^{Serum} = 0{,}450\ mm^2.$$

V_F = 1 cm^3 mit 0,53 mg Zelltrockensubstanz + 2 mg Glukose. Gasraum 5 Vol.-%

$$CO_2 - N_2.$$

$$60' + 2\ mm = 0{,}90\ mm^3.$$

$$Q_M^{N_2} = \frac{0{,}90}{0{,}53} = 1{,}7.$$

Der Versuch lehrt, daß 5 Atm. O_2 die Virulenz und den Stoffwechsel der Asziteszellen zum Verschwinden bringt.

Versuch vom 19.2. 1952. Aszites enthielt 300 mm^3 Zellen/cm^3. 6 cm^3 wurden mit 0,6 mg Heparin 16 Stunden bei 38° bei O_2-Druck von 2 Atm. bewegt.

Impftest: 5 Mäuse vorher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 7 Tagen alle wegen Aszites getötet.

5 Mäuse nachher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 8 Tagen alle wegen Aszites getötet.

Gärungsmessung: Der Aszites wurde nach der 16stündigen Behandlung so weit mit Asziteserum verdünnt, daß 3,38 mm^3 Zellen = 0,59 mg auf 1 cm^3 kamen.

$$38^0.\ \text{Kästchen } v = 4{,}603\ cm^3;\ k_{CO_2}^{Serum} = 0{,}450\ mm^2.$$

V_F = 1 cm^3 mit 0,59 mg Zelltrockensubstanz + 2 mg Glukose.

Gasraum 5 Vol.-% $CO_2 - N_2$.

$$\left.\begin{array}{l} 60' + 21{,}5\ mm = 9{,}65\ mm^3 \\ 60' + 21{,}5\ mm = 9{,}65\ mm^3 \end{array}\right\} Q_M^{N_2} = \frac{9{,}65}{0{,}59} = 16{,}5$$

$$\text{Gärungsrest} \sim \frac{16{,}5}{40} \times 100 = 41\%.$$

Bikarbonatzunahme: 1 cm^3 Aszites enthielt vor der Behandlung 358 mm^3 Bikarbonat-Kohlensäure; nach der 16stündigen Behandlung 680 mm^3 Bikarbonat-CO_2. Zunahme also 322 mm^3 in Bikarbonat gebundene CO_2.

Milchsäurebestimmung nach Avery und Hastings, bei der die Milchsäure mit Übermangansäure zu Essigsäure oxydiert und 1 Mol CO_2 aus 1 Mol Milchsäure entwickelt wird.

1 cm^3 Aszites entwickelte mit Übermangansäure vor der Behandlung 359 mm^3 CO_2 und nach der 16stündigen Behandlung 39 mm^3 CO_2. Die Abnahme betrug also 320 mm^3 Milchsäure, in Übereinstimmung mit der Zunahme des Bikarbonats.

Der Versuch lehrt, daß ein O_2-Druck von 2 Atm. in 16 Stunden bei 38° den Gärungsstoffwechsel zwar wesentlich vermindert, aber die Virulenz nicht vernichtet.

Versuch vom 22. 2. 1952. Aszites enthielt 350 mm^3 Zellen/cm^3 · 4 cm^3 wurden mit 0,4 mg Heparin 16 Stunden bei 38° bei 2,5 Atm. O_2 bewegt.

Impftest: 5 Mäuse nachher mit 0,2 cm^3 Aszites geimpft. Nach 7 Tagen waren alle Tiere gesund.

Gärungsmessung: Der Aszites wurde nach der 16stündigen Behandlung so weit mit Aszitesserum verdünnt, daß 3,12 mm^3 Zellen = 0,546 mg Trockensubstanz auf 1 cm^3 kamen.

$$38^0.\ \text{Kästchen}\ v = 4{,}603\ cm^3;\ k_{CO_2}^{Serum} = 0{,}450\ mm^2.$$

1 cm^3 mit 3,12 mm^3 Zellen = 0,546 mg Trockensubstanz + 2 mg Glukose.

Gasraum 5 Vol.-% CO_2 — N_2.

$$\begin{array}{ll} 60' & +\ 3\ mm \\ 60' & +\ 2\ mm \\ \hline 120' & +\ 5\ mm = 2{,}25\ mm^3.\ Q_M^{N_2} = \dfrac{2{,}25}{2 \cdot 0{,}546} = 2{,}1. \end{array}$$

$$\text{Gärungsrest} \sim \frac{2{,}1}{40} \cdot 100 = 5{,}3\%.$$

Der Versuch lehrt, daß ein O_2-Druck von 2,5 Atm. in 16 Stunden bei 38° den Gärungsstoffwechsel fast vollständig und auch die Virulenz zum Verschwinden bringt.

Schrifttum

Allgemeines Schrifttum über die Giftwirkung höherer O_2-Drucke auf Tiere, Körperzellen und Fermente:

BEAN, J. W., J. Physiology 72 (1931), 27.
DICKENS, F., Biochemical J. 40 (1946), 145, 171.
GESELL, Amer. J. Physiology 66 (1923), 5.
NOVY und SOULE, J. Infect. Diseares 36 (1925), 92.
STADIE, C., und Mitarbeiter, J. Biolog. Chemistry 160 (1945), 191, 209; 161 (1945), 153, 181; 164 (1946), 257.

Spezielles Schrifttum

AVERY, B. F., und HASTINGS, A. BAIRD, J. Biolog. Chem. 94 (1931/32), 273.
WARBURG, O., und HIEPLER, E., Z. Naturforsch. 7b (1952), 193.

21 Isolierung der Hefezymohexase und ihre Kristallisation als Quecksilbersalz*

Von Otto Warburg und Karlfried Gawehn

Anders als Muskelzymohexase ist Hefezymohexase nur im Verein mit gewissen Schwermetallsalzen imstande, Hexosediphosphat zu Triosephosphat zu spalten[1]. Zu den wirksamen Schwermetallen gehören z. B. Zink und 2wertiges Eisen, während 3wertiges Eisen unwirksam ist. Deshalb wird in einer Lösung, die Hefezymohexase, autoxydables Eisensalz und Hexosediphosphat enthält, je nachdem die Bedingungen anaerob oder aerob sind, der phosphorylierte Zucker gespalten oder nicht gespalten. Mit Hefezymohexase und Eisen läßt sich also in reinen Lösungen ein Pasteur-Effekt hervorrufen.

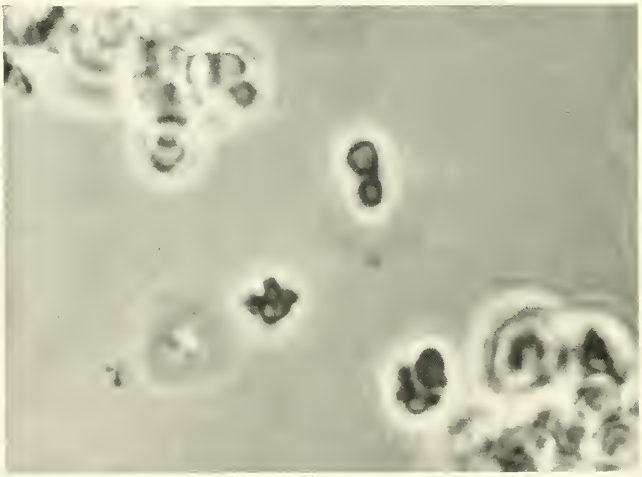


Abb. 1. Quecksilbersalz der Hefezymohexase aus Ammonsulfat. Phasenkontrast. 1400fache Vergrößerung.

Offenbar wäre es für die Zellphysiologie von großer Bedeutung, das Zusammenwirken von Metallsalzen und Hefezymohexase zu erforschen und zu ergründen, warum die aus tierischen Zellen isolierte Zymohexase keiner Schwermetalle zu ihrer Wirkung bedarf; und wahrscheinlich führt der Weg zur Lösung dieser Probleme über die Isolierung der Hefezymohexase, die uns 1943, als wir die Muskelzymohexase kristallisierten, nicht gelang.

Wir beschreiben in dieser Arbeit eine sehr einfache Methode zur Isolierung der Hefezymohexase und ihre Kristallisation als Quecksilbersalz. Wir befreien dabei die Hefezymohexase durch Äthylendiamintetraessigsäure von anderen Schwerme-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Bd. 9b, 206, 1954.

tallsalzen und geben erst dann das Quecksilbersalz hinzu. Wie das Quecksilber aus den kristallisierten Quecksilbersalzen der Enolase[2] und der reduzierenden Gärungsfermente[3], so kann auch das Quecksilber aus dem Hg-Salz der Hefezymohexase durch Cystein sehr schnell entfernt und dann durch andere aktivierende Metallsalze, wie Zinksulfat, ersetzt werden. Dieser Austausch von Quecksilber gegen Zink geht in der Testlösung — die Cystein als Komponente enthält — so schnell, daß man im Test keinen Unterschied in $\Delta \ln \frac{i_0}{i}$ pro Minute findet, ob man die Hefezymohexase als Quecksilbersalz oder als freies Ferment zusetzt.

Schließlich heben wir noch hervor, daß die durch Zinksulfat aktivierte Hefezymohexase nahezu die gleiche katalytische Wirkung besitzt wie die ohne Metalle wirkende Muskelzymohexase, wenn von beiden Zymohexasen die reinen Fermente geprüft werden.

Messung der Wirkung des Ferments

Die Wirkung der Hefezymohexase wurde mit der optischen Methode gemessen, nach der Vorschrift von 1942[1]:

0,5 cm³ *m*/10-K-Hexosediphosphat pH 7,4,
0,3 cm³ Glykokoll 20 mg/cm³,
0,6 cm³ *m*/10-Cysteinchlorhydrat,
0,6 cm³ *n*/10-NaOH,
0,1 cm³ $ZnSO_4$ $1{,}74 \times 10^{-2}$ *molar*,
0,1 cm³ Pyridinnucleotid 6 mg/cm³,
0,3 cm³ Na-Arseniat 5,4proz.,
2,35 cm³ Wasser,
0,1 cm³ Oxydierendes Gärungs-Ferment 4,35 mg/cm³ und zur Zeit Null etwa 0,05 cm³ der zu prüfenden Zymohexase-Lösung.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY MASS.

Wie schon 1948 hervorgehoben wurde[4], reagiert Cystein, das eine Komponente der Testlösung ist, mit Triosephosphat unter Bildung von Thiolverbindungen. Beim optischen Zymohexasetest muß deshalb das oxydierende Ferment zuerst zugesetzt werden, und erst dann darf die Spaltung des Hexosediphosphats durch Zusatz der Zymohexase in Gang gebracht werden. Dann nämlich hat das Triosephosphat keine Zeit, von dem Cystein abgefangen zu werden, sondern reagiert in statu nascendi mit dem Nicotinsäureamid des Pyridinnucleotids.

Das Maß der Zymohexase ist die Zunahme des natürlichen Logarithmus der Lichtschwächung für die Wellenlänge 340 mμ, für die Schichtdicke 1 cm, für die Proteinkonzentration $c = 1$ mg/cm³ pro Minute bei 20°:

$$W = \frac{\Delta \ln i_0/i.}{c \cdot \text{Min.}}.$$

Für die kristallisierte Muskelzymohexase fanden wir früher[1] $W = 200$. Für die durch Zinksulfat aktivierte Hefezymohexase finden wir $W = 200$—240.

Auch die Konzentration des Ferment-Proteins wurde optisch bestimmt, indem zunächst, nach der Vorschrift von 1943[2], das Verhältnis der Lichtabsorptions-Koeffizienten bei 280 mμ und 260 mμ gemessen wurde,

$$n = \frac{\beta_{280}}{\beta_{260}}.$$

Dann wurde der zu n gehörende Wert von β_{280} aus der Tabelle entnommen und die Proteinkonzentration c mit Hilfe der Gleichung

$$(\ln i_0/i) = \beta_{280} \cdot c \cdot d$$

berechnet.

Aceton-Trockenpulver

3 kg Trockenhefe aus Unterhefe werden mit 9 l auf 38° erwärmter m/15-Na_2HPO_4-Lösung verrührt und 2 Stdn. bei 38° digeriert. Dann wird 1 Stde. zentrifugiert. Das Volumen des überstehenden Lebedewsaftes beträgt 3600 cm^3.

Der Lebedewsaft wird auf 0° abgekühlt und zunächst mit 1520 cm^3 kaltem Aceton gefällt, wobei ein Niederschlag entsteht, der abzentrifugiert und verworfen wird. Die überstehende Lösung wird mit 750 cm^3 kaltem Aceton weiter gefällt. Der Niederschlag, der das Ferment enthält, wird abzentrifugiert und im Vakuum bei 0° über Blaugel getrocknet. Auswaage: 103 g. Das trockene Pulver ist haltbar.

Protaminfällung, Erhitzen

40 g Acetontrockenpulver werden mit 800 cm^3 kaltem Wasser verrieben. Ohne zu zentrifugieren werden 1200 mg Salmiridinsulfat, gelöst in 60 cm^3 Wasser, zugegeben. Dann wird zentrifugiert und das Sediment verworfen. Die überstehende Lösung, deren Volumen 800 cm^3 beträgt, wird mit festem Ammonsulfat auf 0,4 Sättigung gebracht und dann 10 Min. auf 65° erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird zentrifugiert und das Sediment verworfen. Die überstehende Flüssigkeit, deren Volumen 800 cm^3 beträgt, wird mit festem Ammonsulfat auf 0,75 Sättigung gebracht; der Niederschlag, der das Ferment enthält, wird abzentrifugiert und kann unter Ammonsulfat aufbewahrt werden.

Adsorption an $Al(OH)_3$

Der Ammonsulfat-Niederschlag aus 80 g Aceton-Trockenpulver wird in 100 cm^3 n/100-NH_3 bei 0°C gelöst. Wenig Ungelöstes wird bei 0° in der Spinco-Zentrifuge bei 40000 g abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Lösung, deren Volumen 200 cm^3 beträgt, wird mit kaltem Wasser auf 2000 cm^3 verdünnt und mit 250 cm^3 30volumproz. $Al(OH)_3$ versetzt. Das $Al(OH)_3$, das 90% des Ferments adsorbiert, wird abzentrifugiert und 2mal mit je 2000 cm^3 kaltem Wasser in der Reibschale verrührt, wobei das Ferment adsorbiert bleibt. Dann wird zentrifugiert und das Ferment von dem $Al(OH)_3$ eluiert, indem man 3mal mit je 240 cm^3 kalter 0,3gesättigter Ammonsulfatlösung, die in bezug auf NH_3 n/100 ist, verrührt und zentrifugiert. Die Eluate sind nicht gleichwertig. Z. B. war für das erste Eluat die Wirkung $W = 140$, für das zweite Eluat $W = 185$ und für das dritte Eluat $W = 200$. Man verwirft in diesem Fall das erste Eluat, vereinigt das zweite und dritte, fällt mit festem Ammonsulfat bis zum Sättigungsgrad 0,77 und zentrifugiert den Niederschlag, der das Ferment enthält, auf der Spinco-Zentrifuge.

Man kann Adsorption an $Al(OH)_3$ und Elution wiederholen, doch steigt dabei im allgemeinen die Wirksamkeit W des Ferments nicht mehr wesentlich.

Unter 0,77 gesättigtem Ammonsulfat bei 0^0 aufbewahrt, ist das Ferment haltbar.

Kristallisation als Hg-Salz (alle Ammonsulfatlösungen sind in bezug auf NH_3 $n/100$)

100 mg Hefezymohexase werden aus dem 0,77 gesättigten Ammonsulfat abzentrifugiert. Auf den voluminösen Niederschlag gibt man bei 0^0 tropfenweise eine mit Ammoniak neutralisierte $m/10$-Lösung von Äthylendiamintetraessigsäure, bis der Niederschlag gelöst ist. Man fällt aus dieser Lösung, die etwa 0,4 gesättigt bezüglich Ammonsulfat ist, durch Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung das Ferment aus, zentrifugiert es hochtourig ab und wäscht den Niederschlag mit 0,77 gesättigter Ammonsulfatlösung, die in bezug auf Äthylendiamintetraessigsäure $m/500$ ist. Der Niederschlag wird in möglichst wenig $n/100$-NH_3 bei 0^0 gelöst, 1 mg mit NH_3 neutralisierte Äthylendiamintetraessigsäure werden auf 1 cm^3 zugegeben. Dann gibt man bei 0^0 gesättigtes Ammonsulfat tropfenweise bis zur Trübung zu und läßt die Lösung im nicht evakuierten Exsiccator langsam 20^0 warm werden, wobei das Ferment ausfällt.

Der Fermentniederschlag, der nunmehr spezifisch so schwer ist, daß er von selbst sedimentiert, wird abzentrifugiert und bei 0^0 tropfenweise mit $n/100$-NH_3 bis zur Lösung versetzt. Dann gibt man zu 1 cm^3 etwa 0,1 cm^3 einer Quecksilbersalzlösung, die in $^1/_2$gesättigtem Ammonsulfat, das in bezug auf NH_3 $n/10$ ist, 3 mg $HgSO_4$ pro cm^3 enthält, und weiterhin gesättigtes Ammonsulfat bis zur schwachen Trübung bei 0^0. Läßt man dann die Flüssigkeit im nicht evakuierten Exsiccator sich langsam auf Zimmertemperatur erwärmen, so scheidet sich das Hg-Salz der Hefezymohexase in regelmäßigen Kristallen ab, die aus Abb. 1 ersichtlich sind.

Die Prüfung des Quecksilbersalzes im optischen Test ergab: 0,00146 mg Protein pro cm^3 erzeugten in 1 Min. bei 20^0, bei 1 cm Schichtdicke, ein $\Delta \ln i_0/i = 0{,}290$, also

$$W = \frac{\Delta \ln i_0/i}{c \cdot \text{Min.}} = \frac{0{,}290}{0{,}00146 \cdot 1} = 199.$$

Man beachte, daß man das Quecksilber zur Wirkungsprüfung nicht zu entfernen braucht, da die Testlösung Cystein enthält.

Literatur

1 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 314 (1943), 149. Warburg, O., Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948.
2 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 310 (1941), 384.
3 Kubowitz, F., und Ott, P., Biochem. Z. 314 (1943), 94.
4 Wasserstoffübertragende Fermente, S. 39.
5 Wasserstoffübertragende Fermente, S. 49.

22 Über das Verhalten von Ascites-Krebszellen zu Zymohexase*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und Günter Lange

Nicht gärende Ascites-Zellen geben Zymohexase an das umgebende Ascites-Serum ab. Gärende Ascites-Zellen nehmen Zymohexase aus dem umgebenden Ascites-Serum heraus oder zerstören die Zymohexase in ihrer Umgebung.

1943 wurde gefunden[1], daß das Blutserum von Tieren und Menschen Gärungsfermente enthält; daß das Gärungsferment Zymohexase sowie einige andere Gärungsfermente in dem Blutserum von Tumor-Ratten vermehrt sind, und daß diese Vermehrung, wenn die Tumoren groß sind, z. B. das 10fache des Normalwerts betragen kann. Virulente Tumoren vermehrten die Zymohexase im Serum mehr als nekrotisierende Tumoren.

Diese Ergebnisse wurden durch eine Arbeit aus dem Institut von Charles Huggins erweitert. Sibley und Lehninger[2] verfolgten die Zunahme der Zymohexase im zeitlichen Verlauf des Tumorwachstums und fanden schnelle Rückkehr zum Normalwert nach Exstirpation der Tumoren. Wurde das Wachstum der Tumoren durch Äthylurethan gehemmt, so ging eine vorher gefundene Zunahme des Ferments auf den Normalwert zurück.

In einer zweiten Arbeit aus dem Institut von Huggins fanden Baker und Dovan[3], daß bei fortgeschrittenem menschlichen Prostata-Carcinom die Zymohexase im Blutserum im allgemeinen stark vermehrt ist, daß die Zymohexase bei Hoden-Exstirpation oder bei Östrogenbehandlung im Serum wieder abnimmt, und daß die Zymohexase im Blut bei Testosterongabe wieder ansteigt.

Aus alledem wird man den Schluß ziehen, daß es die Virulenz der Tumorzellen ist, die für die Vermehrung der Zymohexase im Blut maßgebend ist.

Zymohexase im Blut gravider Tiere

In den drei zitierten Arbeiten wurde übereinstimmend festgestellt, daß die Zymohexase in dem Blut von graviden Tieren oder Menschen, in keinem Stadium der Gravidität, vermehrt ist. Wie die Gärung der Tumoren ist also auch die Zunahme der Zymohexase im Blut eine Erscheinung, durch die sich *im lebenden Tier* das Tumorwachstum von dem normalen Wachstum unterscheidet. Nicht Embryonen, aber Tumoren entwickeln im lebenden Tier, bei Sättigung mit Sauerstoff, Milchsäure. Nicht Embryonen, aber Tumoren erhöhen im Blut lebender Tiere den Gehalt an Gärungsfermenten.

Ascites-Tumor-Zellen

Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors sind von Lettré[4] für biochemische Versuche benutzt und empfohlen worden. Tatsächlich eignen sie sich hervor-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Bd. 9b 109. 1954.

ragend für quantitative Versuche. Resistent beim Zentrifugieren und beim Schütteln in Manometergefäßen, sind sie histologisch reiner als Tumorgewebe. Sie sind das erste Material, mit dem der Stoffwechsel der Tumorzellen quantitativ bestimmt werden konnte, und sie liefern, wie es sein muß, wesentlich höhere Q-Werte als die früher untersuchten Tumorgewebe (die alle Mischgewebe waren) — nämlich anaerob etwa 50 und aerob etwa 30 — für in Ascites-Serum suspendierte Zellen.* Hält man bei derartigen Versuchen, die wegen der großen Gärung der Ascites-Zellen mit sehr verdünntem Ascites ausgeführt werden müssen, Kohlensäuredruck, Bicarbonat und Zucker konstant, so sinkt der Stoffwechsel im Verlauf von stundenlangen manometrischen Versuchen nur wenig ab.

Bei Versuchen mit diesen Zellen wurde früher, in einer Arbeit mit HIEPLER[5], gefunden, daß sie Zymohexase an das umgebende Ascites-Serum abgeben, wenn sie bei 38° ohne Zusatz von Zucker, gehalten werden. Es wurde ferner gefunden, daß die Abgabe von Zymohexase anaerob wesentlich größer ist als aerob, Ergebnisse, die in einer interessanten Arbeit von SCHADE[6] erweitert worden sind.

Im folgenden berichten wir über Versuche, bei denen Zucker zu den Ascites-Zellen zugesetzt wurde, bei denen also das Verhalten von Zymohexase zu *gärenden* Ascites-Zellen untersucht wurde. Den Impftumor verdanken wir Dr. GEORG KLEIN, Stockholm.

Entwicklung der Versuchstechnik

Unverdünnter Ascites gärt so stark, daß bei 38° nach einigen Minuten Zucker und Bicarbonat verbraucht sind. In unseren früheren Versuchen über die Abgabe der Zymohexase, in denen der Ascites unverdünnt war, konnte deshalb nicht bei Gegenwart von Zucker gearbeitet werden. Verdünnt man andererseits den Ascites zu sehr, so kann man keine wesentlichen Effekte erwarten, da die Fermentabgabe in einem stöchiometrischen Verhältnis zur Zellmenge steht. Wir wählten unter diesen Umständen einen Mittelweg und verdünnten den Ascites nicht, wie bei den Messungen der Gärung, auf das 100fache, sondern nur auf etwa das 8fache. Zucker und Bicarbonat wurden dann unter manometrischer Kontrolle ihres Verbrauchs halb- oder ganzstündlich ersetzt, und zu große Verschiebungen des pH nach der sauren Seite wurden vermieden. So konnte das Verhalten der Krebszellen zu Zymohexase auch bei Gegenwart von Zucker, während der Gärung, untersucht werden.

Eine zweite Schwierigkeit betraf die Gerinnungshemmung. Ersatz des Serums durch *Ringer*lösung oder durch eine andere Salzlösung kam nicht in Frage. Andererseits zeigte sich, daß alle gerinnungshemmenden Mittel, auch Heparin, die Effekte verminderten. Folgendes Verfahren bewährte sich unter diesen Umständen: Wir entnahmen den Ascites unter Zusatz einer sehr kleinen Menge Heparin, zentrifugierten und verwarfen das überstehende Serum, das die Hauptmenge des Heparins enthielt. Zur Resuspension der Zellen diente dann ein anderes Ascites-Serum, das ohne Heparin entnommen, nach der Entnahme sofort zentrifugiert, dann 10 Minuten auf 57° erhitzt und schließlich klar zentrifugiert werden

* *Zusatz 1961.* Vergleiche aber Beitrag Nr. 17 dieses Buchs.

war. Unsere Suspensionsflüssigkeit war also „inaktiviertes", ohne gerinnungshemmende Mittel entnommenes Ascites-Serum. Es enthielt keine Zymohexase, da es auf 57° erhitzt worden war, und es enthielt nur sehr wenig Zucker, da in der Zeit zwischen Entnahme und Zentrifugieren fast der gesamte Zucker des Ascites-Serums verbraucht worden war. Dagegen enthielt es viel Milchsäure, im Mittel 1 mg pro cm^3.

Zusatz von Zymohexase

Bei anaeroben Versuchen *ohne* Zucker, bei denen Zymohexase nie von den Krebszellen aufgenommen, sondern immer nur abgegeben wurde, war es nicht nötig, dem inaktivierten Ascites-Serum Zymohexase zuzusetzen. Bei allen anderen Versuchen jedoch mußte Zymohexase zugesetzt werden. Dies geschah in Form von Muskelsaft. Frische Muskeln wurden mit der 3fachen Menge Wasser und mit Sand zerrieben; der Saft wurde bei 12000 g klar zentrifugiert und dem inaktivierten Ascites-Serum in solchen Mengen zugesetzt, daß 1 ccm 3 γ Zymohexase enthielt, eine Zymohexasemenge, die in etwa 0,005 ccm Muskelsaft enthalten ist. Die anderen Fermente und Kofermente, die bei diesem Verfahren dem Ascites-Serum gleichzeitig mit der Zymohexase zugesetzt wurden, störten wegen der Spezifität des Zymohexasetestes nicht. Durch Kontrollen überzeugten wir uns, daß die Zymohexase in *zellfreiem* Ascites-Serum, nach Zusatz des Muskelsaftes, nicht wesentlich abnimmt, woran man mit Hinblick auf verdauende Fermente hätte denken können (vgl. Tab. 2).

Bestimmung der Zymohexase

Die Zymohexase wurde optisch bestimmt[7], nach Zusatz von Hexosediphosphat, DPN, oxydierendem Gärungsferment und Arseniat eine Methode, die inzwischen sehr allgemein angewandt worden ist. Dabei ist die optische Wirkung $W^\star$ definiert als die Zunahme des Logarithmus der Lichtschwächung bei der Wellenlänge 340 mμ pro Stunde auf dem Lichtweg d für unverdünntes Serum, bei 38°.

$$W^\star = \frac{\Delta \ln \frac{i_0}{i}}{\text{Stunden} \cdot d \cdot v}$$

wo d der Lichtweg in cm ist und v das Serumvolumen pro cm^3 Testlösung.

Enthält 1 cm^3 Serum 1 γ Zymohexase, so ist bei pH 7,4 und 38° $W^\star = 47$. Man erhält also die Konzentration der Zymohexase in γ pro cm^3, wenn man $W^\star$ durch 47 dividiert.

$$C = W^\star/47.$$

Da bei den optischen Messungen zu große Ausschläge nicht erwünscht sind, so mußte das Serum für den Test sehr erheblich, z. B. auf das 50—100fache, verdünnt werden, und auch dann genügten noch Ablesungszeiten von 5 Minuten. Durch die Verdünnung wurde die Genauigkeit nicht beeinträchtigt, da es ja immer nur auf die prozentische Änderung der $\Delta \ln i_0/i$-Werte ankam.

Zwei Modifikationen der früheren Vorschriften wurden vorgenommen. Erstens wurde die Lichtschwächung nicht bei der Wellenlänge 340 mμ, sondern bei

366 mμ gemessen, weil 366 mμ leicht aus der Quecksilberlampe zu isolieren ist. $\Delta \ln i_0/i$ für 366 mμ wurde dann durch Multiplikation mit dem Faktor 1,95 auf 340 mμ umgerechnet.

Zweitens wurde in der Testlösung das Glykokoll durch Thioharnstoff ersetzt. Die Testlösung hatte dann die Zusammensetzung:

	3,70	cm^3 Wasser,
	0,5	cm^3 8-proz. Thioharnstofflösung,
	0,25	cm^3 DPN-Lösung (6 mg/cm^3),
	0,1	cm^3 Lösung des oxydierenden Ferments (4,35 mg/cm^3),
	0,2	cm^3 5,4-proz. Na-Arseniat,
	0,05	cm^3 Ascites-Serum,
bei t_0:	0,2	cm^3 m/10-hexosediphosphorsaures K, pH 7,4.
Summe:	5,0	cm^3.

Sibley und Lehninger[2] haben auf die Möglichkeit hingewiesen, daß bei optischen Testen Organextrakte das DPN so schnell zerstören, daß keine Lichtschwächung in den Testen entsteht, auch wenn Zymohexase vorhanden ist. Insbesondere für Leberextrakte solle dieser Einwand ernstlich in Betracht kommen. In Serum haben wir nie DPN-Zerstörung beobachtet. Auch der Muskelsaft, der im Ascites-Serum auf das 14000fache verdünnt ist, zerstört DPN nicht merklich. Zur Sicherheit aber prüfe man jedes neue System auf DPN-Zerstörung, indem man gleiche Mengen kristallisierter Zymohexase zu der Testlösung mit und ohne Organsaft zusetzt. Dann muß man in beiden Fällen gleiche Endwerte der Lichtschwächung erhalten.

Versuchsanordnung

Zu inaktiviertem Ascites-Serum wurde so viel an Zellen und Substanzen zugegeben, daß nach den Zusätzen 1 cm^3 enthielt:

35 mm^3 Ascites-Zellen,
3 mg Glucose,
3 γ Muskelzymohexase,
500 mm^3 in Bicarbonat gebundene Kohlensäure (wobei der Bicarbonatgehalt des inaktivierten Ascites-Serums vorher manometrisch bestimmt werden mußte).

Die Gesamtmenge der Mischung betrug im allgemeinen 5 cm^3. 1 cm^3 davon wurde zentrifugiert, das abgehobene Serum diente zur Bestimmung der Zymohexase zur Zeit Null und wurde zunächst im Eisschrank aufbewahrt. 3 cm^3 wurden in den Hauptraum eines kegelförmigen Manometrie-Gefäßes gegeben (Volumen etwa 17 cm^3), dessen Gasraum 5 Vol.-Proz. CO_2 in O_2 oder N_2 oder Argon enthielt. Nachdem das Gefäß 2 Stunden bei 38° bewegt worden war, wurde 1 cm^3 entnommen, zentrifugiert und das überstehende Serum bei 0° aufbewahrt. Der Rest wurde nach Maßgabe des manometrisch beobachteten Verbrauchs mit Zucker und Bicarbonat versetzt und weiter bei 38° bewegt. Nach weiteren 2 Stunden wurde wieder 1 cm^3 entnommen, zentrifugiert und das überstehende Serum abgehoben. Schließlich wurde in den 3 Serumproben — der Zeit Null und den Zeiten 2 und 4 Stunden — die Zymohexase nach geeigneter Verdünnung mit der optischen Methode bestimmt.

Nr.	+ mit Zellen	Glucose + = mit — = ohne	Gasgemisch 5% CO_2 in	Optischer Test				Änderung der Zymohexase im Ascites-Serum in % des Anfangswertes	Änderung der Zymohexase im Ascites-Serum in γ/cm^3
				v	nach Stdn. Inkubation	$\Delta \ln i_0/i$	W^*		
					0	0,228	137		
1	+	+	N_2	0,02	2	0,198	119		
					4	0,170	102	— 25,6	— 0,75
					0	0,141	169		
2	+	+	Ar	0,01	2	0,1335	160		
					4	0,119	143	— 15,4	— 0,55
					0	0,090	107,5		
3	+	+	Ar	0,01	2	0,078	93,5		
					4	0,066	79	— 26,5	— 0,6
					0	0,0975	117		
4	+	+	Ar	0,01	2	0,0825	99		
					4	0,0765	92	— 21,4	— 0,53
					0	0,141	169		
5	+	+	O_2	0,01	2	0,1285	154		
					4	0,121	145	— 14,2	— 0,51
					0	0,1085	130		
6	+	+	O_2	0,01	2	0,0965	115,5		
					4	0,090	108	— 16,9	— 0,47
					0	0,0935	112		
7	+	+	O_2	0,01	2	0,0875	105		
					4	0,079	95	— 15,2	— 0,36
					0	0,0895	107,5		
8	+	+	O_2	0,01	2	0,075	90		
					4	0,0675	81	— 24,6	— 0,57
					0	0,116	139		
9	+	+	Luft	0,01	2	0,109	131		
					4	0,101	121	— 13	— 0,38
					0	0,0975	117		
10	+	+	Luft	0,01	2	0,0860	103		
					4	0,0787	94,5	— 19,2	— 0,48
				0,01	0	0,1115	134		
11	+	—	Ar	0,004	2	0,0687	206		
				0,002	4	0,0610	366	+ 173	+ 4,93
				0,01	0	0,1045	125,5		
12	+	—	Ar	0,01	2	0,140	168		
				0,004	4	0,084	252	+ 101	+ 2,7
					0	0,097	116		
13	+	—	O_2	0,01	2	0,106	127		
					4	0,1135	136	+ 17,2	+ 0,425
					0	0,0965	116,5		
14	+	—	O_2	0,01	2	0,1025	123		
					4	0,1025	123	+ 5,6	+ 0,138
					0	0,1045	125,5		
15	+	—	O_2	0,01	2	0,1085	130		
					4	0,1085	130	+ 3,6	+ 0,096
					0	0,0965	116,5		
16	+	—	Luft	0,01	2	0,1135	136		
					4	0,1135	136	+ 16,7	+ 0,415
					0	0,104	124,5		
17	+	—	Luft	0,01	2	0,113	135,5		
					4	0,116	139	+ 11,7	+ 0,31

Tabelle 1. Verhalten der Zymohexase in Ascites-Serum mit 35 mm^3 Zellen pro cm^3. v = cm^3 Ascites-Serum in 1 cm^3 Testlösung. $\Delta \ln i_0/i$ = Zunahme des Logarithmus in 5 Min. für d = 1 cm, für λ = 340 mμ bei 38° C.

Nr.	Zellen + mit — ohne	Glucose + mit — ohne	Gasgemisch 5% CO_2 in	Optischer Test				Änderung der Zymohexase im Ascites-Serum in % des Anfangswertes	Änderung der Zymohexase im Ascites-Serum in γ cm³
				v	nach Stdn. Inkubation	$\Delta \ln i_0/i$	W^*		
1	+	+	Ar	0,01	0	0,0935	112		
					2	0,0815	98		
					4	0,0760	91	— 18,8	— 0,45
	—	+	Ar	0,01	0	0,0935	112		
					2	0,0935	112		
					4	0,0900	108	— 3,6	— 0,085
2	+	+	Ar	0,004	0	0,130	390		
					2	0,123	368		
					4	0,116	348	— 10,8	—0,9
	—	+	Ar	0,004	0	0,130	390		
					4	0,1265	380	— 2,6	— 0,21
3	+	+	Ar	0,01	0	0,0970	116,5		
					2	0,0935	112		
					4	0,0890	107	— 8,2	— 0,2
	—	+	Ar	0,01	0	0,0970	116,5		
					4	0,0970	116,5	± 0	± 0
4	+	+	Ar	0,01	0	0,0965	116		
					2	0,0890	107		
					4	0,0835	100	— 13,8	— 0,34
	—	+	Ar	0,01	0	0,0965	116		
					2	0,0950	114		
					4	0,0935	112	— 3,5	— 0,085
5	+	+	Ar	0,01	0	0,075	90		
					2	0,064	77		
								— 14,5	— 0,277
	—	+	Ar	0,01	0	0,075	90		
					2	0,075	90		
								± 0	± 0
6	+	+	Ar	0,01	0	0,1235	148		
					2	0,1080	130		
								— 12,2	— 0,384
	—	+	Ar	0,01	0	0,1205	146		
					2	0,116	139,5		
								— 4,45	— 0,138
7	+	+	Ar	0,01	0	0,101	121		
					2	0,096	115		
					4	0,096	115	— 5	— 0,128
	—	+	Ar	0,01	0	0,101	121		
					2	0,101	121		
					4	0,1025	123	+ 1,65	+ 0,043
8	+	+	Ar	0,01	0	0,112	134		
					2	0,106	127		
					4	0,0935	112	— 16,5	— 0,47
	—	+	Ar	0,01	0	0,108	130		
					4	0,108	130	± 0	± 0

Tab. 2. Verhalten der Zymohexase in Ascites-Serum ohne Zellen und mit 35 mm³ Zellen pro cm³. v = cm³ Ascites-Serum in 1 cm³ Testlösung. $\Delta \ln i_0/i$ = Zunahme des Logarithmus in 5 Min., für d = 1 cm, für λ = 340 mμ bei 38°C.

Zur Zymohexase-Bestimmung in den Zellen wurden 105 mm^3 Ascites-Zellen 3mal mit je 1,5 ccm Wasser extrahiert. In den vereinigten Extrakten wurde die Zymohexase optisch bestimmt.

Wir fanden im Mittel 7 γ Zymohexase in 35 mm^3 Zellen.

Ergebnisse

Die Zellmenge pro ccm betrug bei allen Versuchen 35 cmm. Der Gehalt an Zymohexase in diesen 35 cmm betug im Mittel 7 γ.

Anaerob, bei Abwesenheit von Zucker, gaben 35 cmm Zellen in 4 Stunden bei 38^0 an das umgebende Serum im Mittel 3,8 γ Zymohexase ab, das ist etwa die Hälfte ihres Zymohexase-Gehalts.

Aerob, bei Abwesenheit von Zucker, gaben 35 cmm Zellen unter sonst gleichen Bedingungen weniger Zymohexase ab.

Bei Gegenwart von Zucker, gleichgültig ob die Bedingungen aerob oder anaerob waren, gaben die Zellen keine Zymohexase an die Umgebung ab, sondern nahmen umgekehrt Zymohexase aus ihrer Umgebung heraus. 35 cmm Krebszellen nahmen im Mittel in 4 Stunden 0,5 γ Zymohexase heraus, das ist eine im Vergleich zum Zymohexase-Gehalt der Zellen nicht unbeträchtliche Menge.

Das Ergebnis ist also, daß gärende Krebszellen den Zymohexase-Gehalt ihrer Umgebung vermindern, während nicht-gärende Zellen den Zymohexase-Gehalt ihrer Umgebung vermehren.

Über den Verbleib des von den gärenden Zellen aus ihrer Umgebung herausgenommenen Ferments können wir keine Angaben machen. Wir wissen nicht, ob es von den Zellen zerstört wird, oder ob es in die Zellen als funktionierendes Ferment eingebaut wird. Die Bestimmungen der Zymohexase der Zellen durch Extraktion ist zu ungenau, als daß man die Zunahmen messen könnte.

In den Tabellen 1 und 2 sind die experimentellen Daten und die daraus berechneten Ergebnisse für 25 Versuche wiedergegeben.

Literatur

1 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 314 (1943), 399.
2 Sibley, J. A., und Lehninger, A. L., J. nat. Cancer Inst. 9 (1949), 303.
3 Baker, R., und Govan, D., Cancer Res. 13 (1953), 141.
4 Lettré, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 268 (1941), 59; Z. Krebsforschg. 57 (1950), 1; Naturwissenschaften 38 (1951), 490.
5 Warburg, O., und Hiepler, Ernst, Z. Naturforschg. 7b (1952), 193.
6 Schade, A. L., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 12 (1953), 163.
7 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 314 (1943), 149, 399 sowie Warburg, O., Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948.

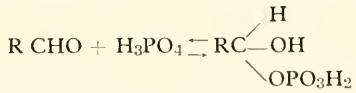
23 Über die Oxydationsreaktion der Gärung*

Von Otto Warburg, Helmut Klotzsch und Karlfried Gawehn

In wässerigen Phosphatlösungen, bei neutraler Reaktion, ohne Protein, oxydiert Pyridinnucleotid Glycerinaldehyd.

I.

1925 fanden wir[1], daß Glycerinaldehyd, der in neutraler wässeriger Lösung nicht wesentlich autoxydabel ist, bei Zusatz von Phosphat durch molekularen Sauerstoff zu Glykolsäure oxydiert wird. Meyerhof und Lohmann[2] fügten 1934 die Beobachtung hinzu, daß sich der phosphorylierte Glycerinaldehyd (Fischer-Ester) entsprechend verhält. Da Glycerin unter dem Einfluß von Phosphat nicht autoxydabel wird, so kann die Ursache der Aktivierung des Aldehyds kaum eine andere sein, als daß primär die Aldehydgruppe mit dem Phosphat reagiert:



Die Aktivierung des Aldehyds durch Phosphat kann man nicht nur mit molekularem Sauerstoff, sondern auch mit andern Oxydationsmitteln nachweisen, z. B. mit Jod, das in neutralen Phosphatlösungen mit Glycerinaldehyd schneller reagiert als bei gleichem pH in andern Lösungen. Am bemerkenswertesten aber, im Hinblick auf die Oxydationsreaktion der Gärung, ist das Verhalten des Glycerinaldehyds in Phosphatlösungen gegen Pyridinnucleotid.

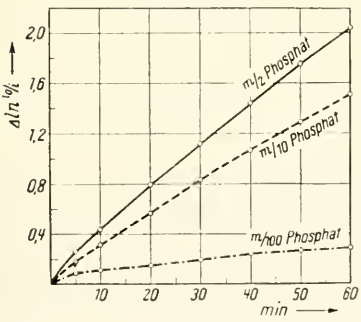


Abb. 1. Die Phosphatlösungen, deren pH 7,7 war, enthielten kein Protein, aber pro cm³ 1 mg Diphospho-Pyridinnucleotid und 3 mg Glycerinaldehyd. Sie wurden unter Luftabschluß in Quarzküvetten (Schichtdicken 1 cm) eingefüllt und bei 38° gehalten. Die Lichtabsorption der Lösungen in diesen Küvetten wurde für die Wellenlänge 340 mμ gemessen.

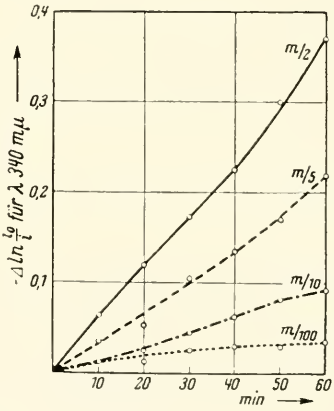


Abb. 2. Die Phosphatlösungen, deren pH 7,7 war, enthielten kein Protein, aber pro cm³ 0,1 mg Dihydro-Diphospho-Pyridinnucleotid und 0,18 mg Glykolaldehyd. Sie wurden unter Luftabschluß in Quarzküvetten (Schichtdicken 1 cm) eingefüllt und bei 38°C gehalten. Die Lichtabsorption der Lösungen in diesen Küvetten wurde für die Wellenlänge 340 mμ gemessen.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 9b (1954): 391.

Wie DOROTHY NEEDHAM[3] fand, reagieren Pyridinnucleotid und Glycerinaldehyd, ohne Protein, in schwach alkalischer Lösung unter Bildung von hydriertem Pyridinnucleotid. Wir fanden, daß diese Reaktion in Phosphatlösungen wesentlich schneller und auch bei neutraler Reaktion vor sich geht. Ein Versuch ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Wie Glycerinaldehyd wird auch Glykolaldehyd durch Pyridinnucleotid oxydiert, in beiden Fällen entsteht die Bande 340 mμ des hydrierten Pyridinnucleotids.* Andererseits reagiert in Phosphatlösungen auch das *hydrierte* Pyridinnucleotid, unter Abgabe von Wasserstoff, mit Aldehyden (Abb. 2).

Sowohl bei diesen Reaktionen als auch bei der Oxydation der Aldehyde durch molekularen Sauerstoff haben wir verglichen, wie sich Orthophosphat, Pyrophosphat und Metaphosphat verhalten, und haben gefunden, daß molekularer Sauerstoff nur in Orthophosphat oxydierend wirkt. Pyridinnucleotide jedoch oxydieren Aldehyde in Pyrophosphat schneller als in Orthophosphat, in Metaphosphat jedoch langsamer als in Orthophosphat. Dihydro-Pyridinnucleotid reduziert Aldehyde wesentlich nur in Orthophosphat.

Es sei dazu bemerkt, daß die physiologische Oxydationsreaktion der Gärung, mit Protein und FISCHER-Ester, nicht nur in Orthophosphat, sondern auch in Pyrophosphat abläuft und daß dabei wie in Orthophosphat (aber anders als in Arseniat) ein Oxydations-Reduktions-Gleichgewicht entsteht.

II.

In den Jahren 1943 bis 1947 versuchte MEYERHOF[4], die Reaktion zwischen FISCHER-Ester und Phosphat durch eine Verschiebung des Triosephosphat-Gleichgewichts nachzuweisen, fand jedoch keine Verschiebung. LIPMANN[5] versuchte, ähnliche Reaktionen durch Änderung der UV-Absorption nachzuweisen, gleichfalls ohne Erfolg. Angesichts der Abb. 1 und 2 wird man aus derartigen Versuchen schließen, daß im Gleichgewicht weniger von dem Reaktionsprodukt vorhanden ist, als mit den Methoden von MEYERHOF und LIPMANN nachgewiesen werden kann; während unsere Methode, die Messung des Verbrauchs an aktivem Wasserstoff — der bei Verbrauch immer wieder nachgebildet wird — offenbar empfindlicher ist.**

III.

Unter dem Einfluß der negativen Ergebnisse von MEYERHOF stellte RACKER[6] 1952 die Theorie auf, daß bei der Oxydationsreaktion der Gärung zunächst der FISCHER-Ester an das Fermentprotein — und zwar an dessen SH-Gruppe — gebunden werde; daß er in dieser Bindung durch das Pyridinnucleotid zur Acylthioverbindung oxydiert werde; und daß dann die Acylthioverbindung durch Phosphorsäure zu Acylphosphat und SH aufgespalten werde. Keine dieser 3 Reaktionen ist bisher durch ein Experiment nachgewiesen worden.

---

* *Zusatz 1961.* Das hierbei entstehende hydrierte Pyridinnukleotid ist nicht imstande, in biologischen Reaktionen Wasserstoff abzugeben und ist also vermutlich ein Isomeres des biologischen Dihydro-Pyridinnukleotids.

** *Anm. b. d. Korr.*: Wir haben inzwischen gefunden, daß eine starke Bande (Enolbande?) bei 290 mμ auftritt, wenn man Glycerinaldehyd in *m*/2-Orthophosphat *anaerob* bei pH 7,7 und 38° stehen läßt; und daß diese Bande bei Sauerstoff-Zutritt abnimmt.

IV.

Die erste Forderung der Theorie RACKERS ist, daß Protein, FISCHER-Ester und Pyridinnucleotid *ohne* Phosphat mindestens ebenso schnell reagieren wie das ganze System *mit* Phosphat. Quantitative Versuche, in denen das Protein nicht Katalysator, sondern stöchiometrischer Reaktionsteilnehmer ist, wären also notwendig. Da aber der Umsatz in der Oxydations-Reaktion der Gärung bei Gegenwart von Phosphat rund 20000 Mole pro Minute beträgt, so müßte der stöchiometrische Fermentumsatz in 0,003 Sek. gemessen werden, während 3 Sek., wegen der Mischungszeit, die kürzeste Zeit ist, in der man den Umsatz messen kann. FISCHER-Ester als Substrat eignet sich also nicht zur Prüfung der Theorie.

Ersetzt man den FISCHER-Ester durch nicht phosphorylierten Glycerinaldehyd, so hat man den Vorteil, daß die Reaktion etwa 1000mal langsamer geht. Dann reicht die mögliche Meßzeit von 3 Sek. gerade aus, um den Umsatz stöchiometrischer Fermentmengen zu messen. Wir fanden, mit reinem oxydierendem Ferment aus Hefe, Glycerinaldehyd und Pyridinnucleotid immer — auch in den ersten 3 Sek. — größere Umsatzgeschwindigkeiten bei Gegenwart von Phosphat als bei Abwesenheit von Phosphat.

V.

Unter den Gründen, die zugunsten der Theorie von RACKER angeführt werden, nehmen die kristallisierten Quecksilbersalze der Fermentproteine, die wir entdeckt haben[7], einen hervorragenden Platz ein: weil wir fanden, daß sie katalytisch inaktiv sind, und daß Cystein ihre katalytische Wirkung wieder herstellt, sollen sie die chemische Bindung der Substrate an die SH-Gruppen der Proteine beweisen. Bedenkt man aber, daß die Hefezymohexase aktiviert wird, wenn man das Quecksilber durch Zink verdrängt, so wird man aus der Inaktivierung der Fermentproteine durch Quecksilber und ihrer Reaktivierung durch Cystein keine weiteren Schlüsse ziehen, als sie bei der Entdeckung der Erscheinungen gezogen worden sind.

VI.

Wenn nun auch nichts sicherer ist, als daß Glycerinaldehyd und Phosphat unter den Bedingungen der Oxydationsreaktion der Gärung miteinander reagieren, und daß dabei Wasserstoff des Aldehyds aktiviert wird, so wäre es trotzdem möglich, daß die lebende Natur von dieser Aktivierung keinen Gebrauch macht, sondern daß sie den Rackerschen Umweg zur Erzeugung des Acylphosphats wählt. Indessen — will man hier etwas beweisen oder widerlegen, so wird man zu den Tatsachen[8] von 1939 nicht nur neue Überlegungen[9], sondern auch neue Tatsachen hinzufügen müssen.

Nachtrag siehe Seite 633.

Literatur

1 WIND, F., Biochem. Z. 159 (1925), 58.
2 MEYERHOF, O., und LOHMANN, K., Biochem. Z. 271 (1934), 89.
3 NEEDHAM, DOROTHY, und Mitarbeiter, Biochem. J. 49 (1951), 113.
4 MEYERHOF, O., und Mitarbeiter, J. biol. Chemistry 149 (1943), 71; 157 (1945), 571; 170 (1947), 1.
5 LIPMANN, F., Advances in Enzymol. 6 (1946), 240.
6 RACKER, E., und KRIMSKY, J., J. biol. Chemistry 198 (1952), 731.
7 WARBURG, O., und CHRISTIAN, W., Biochem. Z. 310 (1941), 384; KUBOWITZ, F., und OTT, P., Biochem. Z. 314 (1943), 94.
8 WARBURG, O., und CHRISTIAN, W., Biochem. Z. 303 (1939), 40.
9 BÜCHER, TH., Biochim. et biophysica Acta (Amsterdam) 8 (1952), 219—222; SIDNEY F. VELICK und Mitarb., J. biol. Chemistry 203 (1953), 527—583; SEGAL, H. L., und BOYERS, P. D., J. biol. Chemistry 204 (1953), 265; OESPER, P., J. biol. Chemistry 207 (1954), 421.

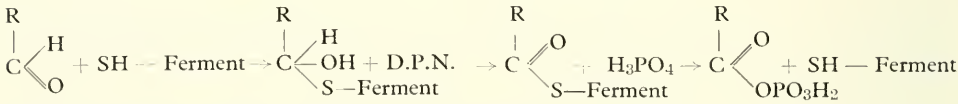
24 Stöchiometrische Versuche mit dem oxydierenden Gärungsferment*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August Wilhelm Geissler

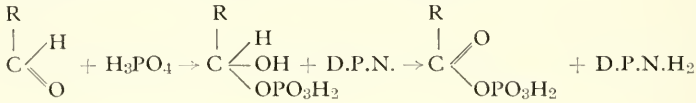
Widerlegung der Theorie, daß SH des oxydierenden Gärungsferments durch Abgabe und Aufnahme von Wasserstoff an der Wirkung des Ferments beteiligt ist.

Da das oxydierende Gärungsferment bei Sättigung mit Substrat bei Zimmertemperatur pro Mol und Minute etwa 20000 Mole Fischer-Ester oxydiert, so ist die Geschwindigkeit der stöchiometrischen Reaktion zwischen Ferment und Substrat so groß[1], daß sie mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht gemessen werden kann; Messungen, soweit solche vorliegen, sind keine Messungen der chemischen Reaktionsgeschwindigkeit, sondern Messungen von Mischungs- oder Zusatzgeschwindigkeiten. Benutzt man anstatt Fischer-Ester den nicht phosphorylierten Glycerinaldehyd als Substrat, so verläuft die Oxydation des Aldehyds zwar sehr viel langsamer, aber unter den üblichen Versuchsbedingungen doch noch zu schnell zur Messung des stöchiometrischen Umsatzes[2].

Die Messung der stöchiometrischen Reaktion aber wäre erwünscht, um zu entscheiden, ob die Theorie von Racker[3] von 1952 richtig ist:



oder ob unsere einfachere Theorie von 1939 richtig ist:



Wäre die Theorie von Racker richtig, so sollte der Aldehyd bei Abwesenheit und bei Gegenwart von Phosphat in der stöchiometrischen Reaktion gleichschnell oxydiert werden und der Einfluß des Phosphats auf die Geschwindigkeit erst bei mehrfacher Reaktion des Ferments, also bei der Katalyse, auftreten. Ist unsere Theorie richtig, so sollte der Einfluß des Phosphats bereits bei der stöchiometrischen Reaktion vorhanden sein.

Wir haben deshalb nach Möglichkeiten der Messung der stöchiometrischen Reaktion gesucht und gefunden, daß die Messung leicht ist, wenn man von der Feststellung Coris[4] Gebrauch macht, daß das aus Muskeln gewonnene oxydierende Ferment festgebundenes reaktionsfähiges Pyridinnucleotid enthält. Setzt man zu diesem Ferment Glycerinaldehyd, aber kein Pyridinnucleotid hinzu, so hat man zwei Vorteile: erstens, daß die Reaktion wegen der niedrigen Konzentration des Pyridinnucleotids sehr langsam verläuft und zweitens, daß man sicher ist, daß man nur die stöchiometrische und keine katalytische Reaktion vor sich hat, da ja nur das an das Protein gebundene Pyridinnucleotid vorhanden ist.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 12b (1957): 47.

Ein derartiger Versuch ist in der Abbildung graphisch dargestellt. Wie man sieht, wird bei Abwesenheit von Phosphat oder Arseniat der Aldehyd nicht oxydiert. Bei Gegenwart von Phosphat oder Arseniat wird der Aldehyd oxydiert, und zwar nach dem einfachen Gesetz, das wir für die Kinetik aller derartiger Reaktionen gefunden haben[5].

$$\frac{dc}{dt} = v_0 \cdot \frac{c_0 - c}{c_0}$$

oder integriert:

$$c = c_0 \left(1 - e^{-\frac{v_0}{c_0} \cdot t}\right)$$

wo v_0 die Anfangsgeschwindigkeit bedeutet, c_0 die Gesamtkonzentration des Ferments und c die Konzentration des zur Zeit t reduzierten Ferments.

Bei dem Versuch war der Glycerinaldehyd gegenüber dem Pyridinnucleotid in großem Überschuß, während von dem gebundenen Pyridinnucleotid nur einige γ pro cm³ vorhanden waren. Wurde viel Pyridinnucleotid zugesetzt, z. B. 100 oder 1000 γ pro cm³, so wurde der Aldehyd auch ohne Zusatz von Arseniat oder Phosphat oxydiert, weil dann kleine Verunreinigungen an Phosphat schon genügten, um eine merkliche Reaktionsgeschwindigkeit zu erzeugen.

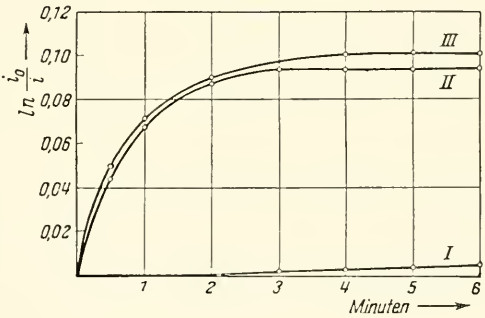


Abb. 1. 1 mg oxydierendes Ferment pro cm³ (Präparat von Böhringer und Söhne, Mannheim-Waldhof). 3 mg D-L-Glycerinaldehyd pro cm³, der bei t_0 zugesetzt wird. Lösungsmittel: $\frac{m}{10}$-Triaethanolamin-HCl-Puffer, pH 8,0. 20°. Lichtweg 1 cm. Wellenlänge 340 mμ. Kurve I: Ohne Zusatz von Phosphat oder Arseniat. Kurve II: 10^{-5} Mole Arseniat pro cm³. Kurve III: 10^{-5} Mole Phosphat pro cm³.

Der Versuch* entscheidet gegen RACKER und zugunsten unsrer Auffassung, die von vorneherein wahrscheinlich war, weil Glycerinaldehyd — ohne Protein — durch Lösen in Phosphat oder Arseniat autoxydabel[1] wird, während einen Versuch von entsprechendem Gewicht RACKER zugunsten seiner Theorie nicht anführen konnte. Im Gegenteil, gibt man, ohne Protein, SH-Cystein zu FISCHER-Ester, so reagiert der Aldehyd in wäßriger Lösung schnell mit dem SH zu Thioacetal, aber der Aldehyd wird dabei nicht aktiviert, sondern *in*aktiviert, worauf wir bereits 1948, 4 Jahre vor RACKERS Theorie, hingewiesen haben[6].

---

* *Zusatz 1961.* Diesem Versuch wird von P. D. BOYER (The Enzymes, Vol. 1, Seite 579, New-York Academic Press 1959) entgegengehalten "that reduction of the D.P.N. bound to inactive enzyme depended on recycling of the active enzyme which could occur by removal of the acyl group through reaction with inorganic phosphate or arsenate." Bekanntlich kann man, mit einer hinreichenden Zahl unbewiesener Hypothesen, alles was man wünscht, beweisen oder widerlegen.

Zugunsten seiner Theorie hat RACKER die Quecksilbersalze der Fermente angeführt, die kristallisiert worden sind; deren Hg-Gehalt gleich 1 bis 2 Atome Hg pro Mol-Ferment gefunden worden ist; die katalytisch inaktiv sind; und die durch Zusatz von SH-Cystein sofort reaktiviert werden. Nirgends sind diese Tatsachen besser und länger bekannt als in Dahlem, wo sie entdeckt worden sind[7]. Aber der oben abgebildete Versuch beweist, daß es falsch wäre, sie zugunsten der Theorie von RACKER auszunutzen.

Literatur

1 WARBURG, O., KLOTZSCH, H., und GAWEHN, K., diese Z. 9b (1954), 391.

2 KOEPPE, O. J., BOYER, P. D., und STULBERG, M. P., J. biol. Chemistry 219 (1956), 569, haben auf meinen Vorschlag den nicht phosphorylierten Glycerinaldehyd als Substrat benutzt, aber durch eine unerlaubte Extrapolation auf die Zeit Null geschlossen, daß Phosphat keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der stöchiometrischen Reaktion habe. Bei ihrer Versuchsanordnung war die Geschwindigkeit der stöchiometrischen Reaktion noch viel zu groß.

3 RACKER, E., J. biol. Chemistry 19 (1951), 685; 198 (1952), 731.

4 CORI, GERTI und CARL, und Mitarb., J. biol. Chemistry 173 (1948), 619.

5 WARBURG, O. Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948, S. 34.

6 WARBURG, O., Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948, S. 39.

7 WARBURG, O., und CHRISTIAN, W., Biochem. Z. 310 (1941), 384; F. KUBOWITZ und P. OTT unter Leitung von O. WARBURG, Biochem. Z. 314 (1943), 94, sowie O. WARBURG, Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948; O. WARBURG und K. GAWEHN, diese Z. 96 (1954), 206.

25 Messung der Lichtabsorption *in Chlorella* mit der Ulbrichtschen Kugel*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Unsere Versuchsanordnung ist in der Abbildung veranschaulicht. Je nach der Größe der Versuchsgefäße benutzen wir Kugeln von 50 oder 100 cm Durchmesser. Detektor ist eine Selenzelle** mit Multiflex-Galvanometer (MG 2) von Bruno Lange, deren Linearität in jedem Fall geprüft wird. Folgendes ist hervorzuheben:

1. Als Lichtquellen bei der Absorptionsmessung benutzen wir 500 Watt-Metallfaden-„Kinolampen", aus deren Strahlung mit zwei hintereinander geschalteten Interferenzscheiben der gewünschte Spektralbezirk isoliert wird. Wegen der größeren Konstanz der Strahlung sind Metallfadenlampen hier den Quecksilberlampen vorzuziehen.

2. Zelltrog und Kontrolltrog befinden sich immer gleichzeitig in der Kugel. Durch ein Gestänge, das von außen betätigt wird, wird abwechselnd der Zelltrog oder der Kontrolltrog in den direkten Lichtstrahl gebracht.

3. Der Kontrolltrog enthält eine Suspension von *Chlorella*, aus der alle Farbstoffe mit Methanol extrahiert worden sind (vgl. Vorschrift unten). Durch die „weißen Zellen" wird eine gleichmäßigere Verteilung des Lichts in der Kugel erreicht, als wenn der Kontrolltrog Wasser enthielte.

4. Wesentlich bei der Methode ist nicht nur, daß die Zellen während der Absorptionsmessung wie bei der Photosynthesemessung bewegt werden, sondern auch, daß der Lichtstrahl synchron mit den Zellsuspensionen bewegt wird, damit die Gefäße auch bei der Absorptionsmessung ausgeleuchtet werden. Die Abbildung erläutert, wie diese synchrone Bewegung des Lichtstrahls bewerkstelligt wird.

5. Eine Absorptionsmessung besteht dann aus 3 Galvanometerausschlägen: 1. wenn die weißen Zellen im direkten Strahl sind; 2. wenn die grünen Zellen im direkten Strahl sind und 3. wenn die weißen Zellen wieder im direkten Strahl sind. Seien zum Beispiel diese Ausschläge 100 Skalenteile, 90 Skalenteile und wieder 100 Skalenteile, so ist die Durchlässigkeit der Zellsuspension 90% und ihre Absorption 10%.

6. Die Fehlermöglichkeit beträgt dabei 0,25 Skalenteile. Eine Lichtabsorption von 10% kann also mit einer Genauigkeit von 2,5 vom Wert der Absorption gemessen werden.

Das Problem der Lichtabsorption in dünnen Zellsuspensionen ist damit vollständig gelöst. Sind die Gefäße zur manometrischen Photosynthese-Messung vorbereitet und mit Zellsuspension gefüllt, so werden sie zunächst in die Kugel gebracht, und hier wird ihre Absorption in wenigen Minuten gemessen.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 9b (1954): 181.

** *Zusatz 1961.* Wir benutzen heute als Detektor einen R.C.A.-Vervielfacher.

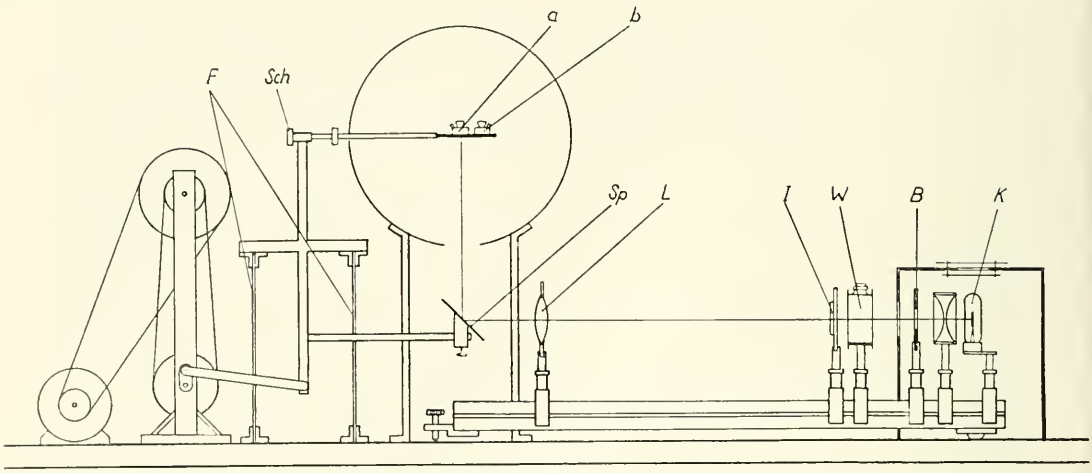


Abb. 1. K ist eine Metallfadenlampe 500 W, 5 A mit einer leuchtenden Fläche 8,1 × 7,5 mm („Schmalfilmlampe" der Osram A.G., Berlin). B ist eine Blende mit rechteckiger Öffnung und Seitenverhältnis 2,8 × 4,9 cm. W ist eine Wasserküvette von 5 cm Dicke. I ist eine Interferenzscheibe oder ein Interferenzscheibenpaar zur Isolierung des gewünschten Spektralbezirks. L ist eine Linse, die die Blende B auf den Gefäßböden a oder b verkleinert abbildet, und zwar so, daß die Gefäße nicht vollständig, aber zum größeren Teil ausgeleuchtet sind. Sp, der bewegliche Spiegel, und Sch, der Schieber, sind so auf den Federn F montiert, daß sie durch den Antrieb in waagerechter Richtung bewegt werden können; a und b sind Manometrietröge, von denen der eine grüne Zellen (Chlorella) und der andere weiße Zellen (extrahierte Chlorella) enthält. Der Trog, der die grünen Zellen enthält, ist derselbe Trog, der nach der Absorptionsmessung zur manometrischen Messung der Photosynthese benutzt wird. Lockert man Sch, so kann jeweils a oder b in den Lichtstrahl gebracht werden. Während der Bewegung, die nach Hub und Frequenz mit den Bedingungen der Photosynthese-Messungen übereinstimmt, ist Sch fest angezogen. Der in die Kugeloberfläche eingebaute Detektor ist eine Selenzelle, bei Messungen mit monochromatischem Licht oder eine Thermosäule bei Messungen mit polychromatischem Licht. Der Schatter vor dem Detektor (in der Abb. nicht eingezeichnet) ist nicht rund, sondern oval (mit vertikal großer Achse) und ist so zu montieren, daß das Auge, an Stelle des Detektors gebracht, weder den Zenith der Kugel noch die Öffnung sehen kann, durch den der Lichtstrahl unten in die Kugel eintritt. Diese untere Öffnung der Kugel muß so groß sein, daß *auch bei der Bewegung der Tröge* alles vom Boden der Tröge reflektierte Licht durch die Öffnung der Kugel wieder austritt.

Zur Kontrolle der Anordnung überzeuge man sich davon, daß die weißen Zellen, wenn sie sich im direkten Strahl befinden, in der Ruhe und bei Bewegung die gleichen Galvanometer-Ausschläge geben. Die grünen Zellen dagegen geben beim Schütteln größere Ausschläge als in der Ruhe, wobei der Unterschied um so größer ist, je dichter die Zellen sind.

Weiße Zellen

Chlorella wird zunächst in der Zentrifuge mit dest. Wasser gewaschen. Dann wird in wenig dest. Wasser aufgewirbelt, viel Methanol hinzugefügt, die grüne Lösung abzentrifugiert und das gleiche wiederholt, bis die Zellen hinter dem Schwarzglas einer Analysenlampe nicht mehr rot fluoreszieren. Dann wird das Methanol durch Zentrifugieren entfernt und durch Kulturlösung ersetzt. Die Stamm-Suspension dieser weißen Zellen wird im Eisschrank aufbewahrt und für die Absorptionsmessungen auf die jeweilige Konzentration der grünen Zellen gebracht.

26 Über die Berücksichtigung der Retention der Kohlensäure bei Messungen der Photosynthese in Kulturlösungen*

Von Otto Warburg

In einer vorhergehenden Mitteilung[1] haben wir die Ansicht geäußert, daß die Retention der Kohlensäure, das ist die chemische Bindung der Kohlensäure in den Versuchsflüssigkeiten, bei der 2-Gefäß-Methode nur dann berücksichtigt werden müsse, wenn die Änderungen der *gesamten* Kohlensäure, der freien + der chemisch gebundenen, berechnet werden sollen; während die Änderung der *freien* Kohlensäure ohne Berücksichtigung der Retention berechnet werden könne. Es wird hier gezeigt, daß dies zwar für 1-Gefäß-Methoden, nicht aber für die 2-Gefäß-Methode stimmt.

Betrachten wir zunächst den Fall *eines* Gefäßes, in dem in einer retinierenden Flüssigkeit, z. B. Hefezellen durch Gärung den CO_2-Druck h_{CO_2} erzeugt haben sollen. Dann ist Änderung der freien CO_2:

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \times k_{CO_2};$$

und die Änderung der gesamten CO_2:

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \times (k_{CO_2} + R),$$

wo k_{CO_2} die Gefäßkonstante für die freie CO_2 bedeutet und R die pro mm Druckänderung chemisch gebundene CO_2. Je nachdem man den Druck h_{CO_2} mit k_{CO_2} oder $(k_{CO_2} + R)$ multipliziert, erhält man die Änderung der freien oder der gesamten CO_2.

Betrachten wir weiterhin den Fall von 2 Gefäßen, deren Volumina verschieden sind und in die gleiche Volumina der Hefezellen-Suspension eingefüllt worden sind, so ist die Retention R in den beiden Gefäßen gleich, aber die k_{CO_2}-Konstanten sind verschieden. Dann ist

Änderung der:	Gefäß I	Gefäß II
freien CO_2	$x^{I}_{CO_2} = h^{I}_{CO_2} \times k^{I}_{CO_2}$	$x^{II}_{CO_2} = h^{II}_{CO_2} \times k^{II}_{CO_2}$
gesamten CO_2	$x^{I}_{CO_2} = h^{I}_{CO_2} \times (k^{I}_{CO_2} + R)$	$x^{II}_{CO_2} = h^{II}_{CO_2} \times (k^{II}_{CO_2} + R)$

Da in beiden Gefäßen in summa das gleiche vor sich geht (da sie gleichviel Zellen enthalten), so muß die Änderung der *gesamten* CO_2 in den beiden Gefäßen gleich sein, d. h., in bezug auf die *gesamte* CO_2 ist die Voraussetzung der 2-Gefäß-Methode

$$x^{I}_{CO_2} = x^{II}_{CO_2}$$

erfüllt. Dann aber kann, wie ein Blick auf die vier Gleichungen lehrt, die Änderung der *freien* CO_2 in den beiden Gefäßen nicht gleich sein, d. h. in bezug auf die *freie* CO_2 ist die Voraussetzung der 2-Gefäß-Methode

$$x^{I}_{CO_2} = x^{II}_{CO_2}$$

nicht erfüllt.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Bd. 9b (1954): 302.

Allgemein folgt aus diesen Überlegungen, daß man bei der 2-Gefäß-Methode eine vorhandene Retention der CO_2 berücksichtigen muß, wie dies auch bisher in unseren Arbeiten geschehen ist[2]. Würde man, wenn sich Sauerstoff und Kohlensäure ändern, bei vorhandener Retention x_{O_2} mit k_{CO_2} statt mit $(k_{CO_2} + R)$ berechnen, so würde man einen falschen Wert für x_{O_2} finden.

Abb. 1.
Gefäß zur Retentionsbestimmung in Chlorella-Kulturlösung.*

Zur *Bestimmung der Retention* der CO_2 benutzen wir Gefäße (vgl. Abb. 1) von etwa 25 cm³ Inhalt, in die wir 7 cm³ der zu prüfenden Flüssigkeit einfüllen. Der geteilte Ansatz enthält, zunächst getrennt, 0,2 cm³ $n/20$-$NaHCO_3$ und 0,2 cm³ $n/1$-H_2SO_4. Nach Sättigung mit 5 oder 10 Vol.-Proz. Kohlensäure gibt man die Schwefelsäure in das Bicarbonat, wobei etwa 100 mm Druck entstehen, wenn die Flüssigkeit nicht retiniert, und weniger, wenn die Flüssigkeit retiniert. Für 7 cm$_g$ Kulturlösung, in der wir die Chlorella züchten und ihre Photosynthese messen, fanden wir bei Sättigung mit 5 Vol.-Proz. Kohlensäure, bei 20°, bei verschiedenem pH, pro mm *Brodie* CO_2-Druck, die folgenden Retentionen.

Bedenkt man, daß die k_{CO_2}-Konstanten bei unseren Messungen der Photosynthese in Kulturlösung von der Größenordnung 1,5 bis 2,0 mm² sind, so sieht man aus den mitgeteilten Zahlen, daß zwischen pH 4 und 5 die Retention R gegen k_{CO_2} zu ver-

---

* *Zusatz 1961.* Heute benutzen wir zur Bestimmung der Retention der Kohlensäure die Gefäße mit Wanne und Birne (Arbeit 41 dieses Buchs).

pH	4,2	5,25	5,85	6,6
Retention $R \left[\frac{mm^3\ CO_2}{(mm\ Brodie)}\right]$	0	0,032	0,145	0,473

nachlässigen ist, d. h., daß die Retention der CO_2 zu gering ist, als daß sie berücksichtigt werden müßte. Sehr lange Versuche wird man, um das Auftreten einer merklichen Retention hinauszuschieben, mit 10 Vol.-Proz. CO_2 im Gasraum beginnen.

Literatur

1 Z. Naturforschg. 8b (1954), 675.

2 Biochem. Z. 164 (1925), 481.

27 Über die Wirkung sehr schwachen blaugrünen Lichts auf den Quantenbedarf der Photosynthese*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl, Walter Schröder, Wolfgang Buchholz und Erhard Theel

Die Entdeckung einer katalytischen Wirkung des Lichts auf den Energieumsatz der Photosynthese wird beschrieben: Anders als die stöchiometrische Wirkung des Lichts, die durch die Zahl der absorbierten Quanten bestimmt wird, ist diese katalytische Wirkung des Lichts wellenlängenbedingt.

Chlorella, an einem Südfenster unter Zusatz von Metallfadenlicht gezüchtet, gab bei der Messung des Quantenbedarfs mit monochromatischem Licht in den Monaten Mai bis Juli oft bessere Energieausbeuten als im Herbst und im Winter. Bei dem Versuch, diesen Einfluß der Jahreszeiten aufzuklären, fanden wir, daß man die durch monochromatisches grünes oder rotes Licht erzielten Energieausbeuten sehr wesentlich erhöhen kann, wenn man zu dem Meßlicht die blaugrünen Cadmiumlinien 468 mμ, 480 mμ und 509 mμ hinzufügt, in Intensitäten, die gegen die Intensitäten des Meßlichts zu vernachlässigen sind. Ist dabei die Intensität des Meßlichts groß, so kann man durch Zugabe und Fortnahme des Cadmiumlichts in 30-Min.-Perioden abwechselnd gute oder schlechte Energieausbeuten erzeugen.

Zwei Lampen waren für die Versuche notwendig, eine 500-Watt-Hg-Hochdrucklampe**, aus der mit Linsen, Blenden und Filtern ein intensiver Strahl der Wellenlänge 546 mμ isoliert wurde, der durch den Boden der Manometriegefäße in die Zellsuspensionen eindrang; und eine 60-Watt-Cadmiumlampe*** mit Blaufilter, die in 1 m Entfernung vor dem Thermostaten angebracht wurde und die Zellsuspensionen in den Manometriegefäßen von allen Seiten diffus beleuchtete. Die Intensität des in die Zellsuspensionen eingestrahlten grünen Lichts wurde bolometrisch gemessen und betrug 50 oder 100 oder 180 mm^3 Quanten pro Minute. Die Intensität des in die Zellsuspensionen eingestrahlten blaugrünen Lichts wurde aktionmetrisch gemessen, indem die Zellsuspensionen durch ein Aktinometergefäß ersetzt wurden, und betrug 0,3 mm^3 Quanten pro Minute, wodurch nur ein kleiner Teil der Atmung kompensiert wurde. Wurde nun das blaugrüne Cadmiumlicht abwechselnd zu dem starken Meßlicht zugesetzt und wieder fortgenommen, so wurden die folgenden Erscheinungen beobachtet, von denen wir glauben, daß sie auf dem Gebiet der Photosynthese, theoretisch und experimentell, vieles ändern werden:

Versuchsanordnung: 7 mm^3 Zellen pro Manometriegefäß, dessen Grundfläche 8,3 cm^2 betrug. Absorption des grünen Meßlichts anfangs 7,2%, im Lauf des 6stündigen Versuchs wegen Chlorophyllzunahme auf 11,5% steigend. Messung der Absorption mit der Ulbrichtschen Kugel gegen weiße Zellen. Im Gasraum 5% CO_2, 10% O_2. Argon. p_H 5,3. Temperatur des Thermostaten 20°. Zellmaterial

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 9b (1954): 164.

** Osram-Werke, Berlin.

*** „Jupiterlampe", Heraeus, Hanau.

1tägige Kultur. Saat 60 mm³, Ernte 280 mm³. Grünes Licht kontinuierlich 6 Stunden lang. Nur die positiven Drucke wurden bei der Berechnung von x_{O_2}, x_{CO_2} und $1/\varphi$ berücksichtigt; die Atmung wurde also, nach unseren letzten Vorschriften*, vernachlässigt.

Der Versuch zeigt:

1. daß bei Zusatz des Cadmiumlichts zu dem Meßlicht die Energieausbeute ansteigt und daß die Energieausbeute bei Fortnahme des Cadmiumlichts wieder absinkt;

2. daß dabei das Absinken der CO_2-Aufnahme dem Absinken der O_2-Entwicklung voraneilt;

3. daß offenbar das Cadmiumlicht eine zur Photosynthese notwendige Substanz erzeugt, die bei Fortnahme des Cadmiumlichts schnell wieder verbraucht wird; eine Substanz, die möglicherweise in „Sommer-Chlorella" im Überschuß vorkommt.

Zeit (Min.)	Cd-Licht (0,15 mm³ Quanten pro Min. absorbiert)	Meßlicht λ 546 (mm³ Quanten pro Min. absorbiert)	O_2 entwickelt (mm³) X_{O_2}	CO_2 absorbiert (mm³) X_{CO_2}	CO_2/O_2	$1/\varphi$ $(h \cdot \nu/O_2)$
60	+	6,72	+ 91,5	— 108	— 1,18	4,4
30	—	7,67	+ *34,8*	— *36*	— 1,04	*6,6*
30	—	7,67	+ *26,3*	— *22*	— 0,84	*8,8*
30	—	7,67	+ *21,7*	— *14*	— 0,65	*10,6*
30	+	7,85	+ 42,3	— 47	— 1,11	5,6
60	+	8,33	+ 105	— 122	— 1,16	4,7
60	+	4,90	+ 73	— 90	— 1,23	4,0
30	+	18,5	+ 100	— 119	— 1,19	5,5
15	—	19,7	+ *28*	— *25*	— 0,89	*10,5*
15	—	19,7	+ *11,5*	— *2*	— 0,17	*26*

Nicht wegen der Cadmiumwirkung, sondern allgemein möchten wir empfehlen, den Chlorophyllgehalt der Chlorella nicht über 4% ihres Trockengewichts steigen zu lassen, wenn es auf gute Ausbeuten ankommt. Wir haben Grund zu der Annahme, daß bei wesentlich höheren Chlorophyllgehalten ein Teil des Chlorophylls photosynthetisch unwirksam ist, was man leicht verstehen kann, wenn man einen Chlorophyllgehalt der gesamten Chlorella von 6—8% auf ihre Grana umrechnet.

Wenn man nunmehr *immer*, im Winter wie im Sommer, bei Messungen der Photosynthese schwaches blaugrünes Licht hinzufügt, und wenn man ferner die Bedingung nicht zu hohen Chlorophyllgehalts beachtet, wird man kaum mehr imstande sein, schlechte Energieausbeute bei der Photosynthese zu finden.

* Z. Naturforschg. 8b, 675 (1953).

27a Krebsforschung*

Von Otto Warburg, Berlin-Dahlem

Dr. Ernst Telschow zu seinem 65. Geburtstag am 31. Oktober 1954 gewidmet

1923[1] wurde in Dahlem die Gärung der Tumoren entdeckt, diejenige biochemische Eigenschaft, durch die sich das Tumorwachstum von dem normalen Wachstum unterscheidet. Zwar spalten alle normalen wachsenden Körperzellen bei Abschluß von Sauerstoff Zucker zu Milchsäure, aber bei Zutritt von Sauerstoff verschwindet in den normalen Zellen diese Gärung und macht einem reinen Oxydationsstoffwechsel Platz; während in den Tumorzellen die Atmung zu klein oder zu unwirksam ist und eine erhebliche Gärung übrig läßt — die aerobe Gärung der Tumoren, deren Ursache also die insuffiziente Atmung der Tumorzellen ist.

Kein Tumor ist seit 1923 gefunden worden, der aerob nicht gärt, und kein normales wachsendes Gewebe ist gefunden worden, das im Körper, angeschlossen an den Kreislauf, bei Sättigung mit Sauerstoff gärt.

Ascites-Tumorzellen

Ein Fortschritt ist in der letzten Zeit dadurch erzielt worden[2], daß als Versuchsmaterial an Stelle von Tumoren, die immer neben Tumorzellen auch normale Zellen enthalten, die frei in der Bauchhöhle lebenden Ascites-Tumorzellen verwendet wurden, Krebszellen, die ohne wesentliche Verunreinigung mit andern Körperzellen gewonnen werden können. Wie zu erwarten war, wurden sehr große Gärungswerte für dieses reine Krebszellenmaterial gefunden.

Bezogen auf das Trockengewicht der Zellen, betrug bei 38° die Milchsäurebildung pro Stunde anaerob bis zu 27% und aerob bis zu 14% des Zellgewichts.

Entstehung der aeroben Gärung

Von den beiden energieliefernden Stoffwechselvorgängen der Körperzellen, der Atmung und der Gärung, ist die Atmung der empfindlichere, und so ist es leicht, in normalen wachsenden Körperzellen den Stoffwechseltypus der Tumorzellen zu erzeugen, z. B. indem man kleine Mengen Blausäure oder arsenige Säure in die Zellen hineinbringt. Dann sinkt die Atmung, und die aerobe Gärung erscheint.

Auch gegen Sauerstoffmangel ist die Atmung empfindlicher als die Gärung. Entzieht man wachsenden Körperzellen für einige Stunden den Sauerstoff und sättigt sie dann wieder mit Sauerstoff, so ist ein Teil der Atmung verschwunden und eine dem Atmungsschwund entsprechende aerobe Gärung erschienen.

Indessen erhielten wir bei derartigen Versuchen niemals Tumorzellen aus normalen Zellen. Offenbar gehört zur Umwandlung normaler Körperzellen in Tumorzellen nicht nur, daß die Atmung geschädigt wird und daß die Atmungsschädigung

* Aus: Die Naturwissenschaften 41 (1954): 485.

irreversibel ist, sondern darüber hinaus, daß die Schädigung der Atmung bei der Teilung der Zellen bestehen bleibt.

Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß man in Milchsäurebakterien durch Sauerstoffmangel aerobe Gärung heranzüchten kann[3]. Züchtet man aerobe Milchsäurebakterien längere Zeit unter Sauerstoffmangel, so verlieren sie allmählich das zur Atmung notwendige Fermentsystem, und über Zwischenstufen aerob gärender Milchsäurebakterien erhält man schließlich Milchsäurebakterien, die nur noch gären und nicht mehr atmen.

Die Versuche von Goldblatt und Cameron[4]

1953 erschien eine Arbeit von Harry Goldblatt und Gladys Cameron über die Wirkung von Sauerstoffmangel auf wachsende Körperzellen in Versuchen von mehreren Jahren Dauer. Herzfibroblasten wurden in Gewebekulturen, in „rollertubes" nach G. O. Gey[5], $2^1/_2$ Jahre gezüchtet. Ein Teil der Kulturen wurde innerhalb dieser langen Versuchszeit mehrere Male für kurze Zeit Sauerstoffmangel ausgesetzt. In zwei Kulturen entwickelten sich aus den Herzfibroblasten Tumorzellen, aus denen bei Verimpfung auf gesunde Ratten transplantable Fibrosarkome entstanden. In den Kontrollkulturen, die dem Sauerstoffmangel nicht ausgesetzt waren, entwickelten sich keine Tumorzellen.

Wenn diese Versuche, was ich glaube, sich weiterhin bestätigen lassen, so darf man aus ihnen doch nicht schließen, daß Sauerstoffmangel die einzige Ursache ist, durch die im Körper Tumorzellen aus normalen wachsenden Zellen entstehen; aber intermittierender Sauerstoffmangel wird eine häufige Ursache sein, da intermittierender Sauerstoffmangel im Körper, z. B. durch Druck auf die Blutgefäße, häufig vorkommt. Experimentell, in Gewebekulturen, ist es im übrigen viel leichter, die Atmung intermittierend durch Sauerstoffmangel zu schädigen als durch Hinzufügen und Fortnahme von Atmungsgiften, wie arsenige Säure.

Gärungsfermente der Tumoren

Wir kristallisierten ein Gärungsferment aus Rattentumoren[6] und verglichen es mit einem kristallisierten Gärungsferment, das wir aus Rattenmuskeln kristallisiert hatten. Kein Unterschied zwischen den beiden Gärungsfermenten wurde gefunden, weder qualitativ noch quantitativ in bezug auf die katalytischen Wirksamkeiten. Diese Ergebnisse regten zu Versuchen über die Wechselwirkung zwischen den Gärungsfermenten der Tumoren und ihrer Umgebung an.

Läßt man Ascites-Tumorzellen[7] in Ascites-Serum, das keinen Zucker enthält, einige Stunden bei 38° stehen, zentrifugiert dann die Zellen ab und analysiert das Serum, so zeigt sich, daß die Tumorzellen Gärungsferment an das Serum abgegeben haben. Diese Abgabe ist anaerob so groß, daß in einigen Stunden oft die Hälfte des zuckerspaltenden Ferments der Tumorzellen abgegeben wird. Aerob ist die Abgabe geringer, aber doch noch erheblich. Das Ergebnis ist also, daß *Tumorzellen, die nicht gären,* Gärungsferment an die Umgebung abgeben.

Setzt man aber dem Ascites Zucker zu und bringt damit die Gärung in Gang,

so geben nunmehr die Tumorzellen kein Gärungsferment an die Umgebung ab, sondern nehmen umgekehrt Gärungsferment aus ihrer Umgebung heraus, sei es, daß sie Gärungsferment zerstören, sei es, daß sie es als intaktes Ferment aufnehmen. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Bedingungen aerob oder anaerob waren.

Während wir bei diesen Versuchen die Wechselwirkung zwischen den Gärungsfermenten der Tumoren und ihrer Umgebung in vitro untersuchten, haben wir in anderen Versuchen die gleiche Wechselwirkung im lebenden Tier untersucht. Wir fanden[8], daß das Blutserum von Tumortieren mehr Gärungsferment enthält als das Blutserum normaler Tiere. Diese Vermehrung der Gärungsfermente im Blutserum, die das 10fache des Normalwerts betragen kann, wenn die Tumoren groß sind, ist an die Virulenz der Tumorzellen gebunden. Man findet nur wenig Vermehrung, wenn die Tumoren nekrotisieren oder wenn man das Wachstum der Tumoren durch Urethan[9] hemmt. Man findet die Vermehrung sehr erheblich in vorgeschrittenen Stadien von menschlichem Prostata-Krebs, wie in dem Institut von Charles Huggins in Chicago von Baker und Dovan[10] kürzlich gefunden worden ist. Wurde die Virulenz des Prostata-Krebses durch Behandlung der Patienten mit Oestrogen vermindert, so ging sehr bald die Konzentration des Gärungsferments im Blutserum zurück. Wurde dann die Virulenz des Prostata-Krebses durch Behandlung der Patienten mit Testosteron wieder erhöht, so stieg alsbald die Konzentration der Gärungsfermente im Blutserum wieder an. Die Idee, daß virulente Krebszellen Gärungsfermente aus normalen Körperzellen zum Übertritt in den Blutkreislauf veranlassen, ist nach diesen Versuchen naheliegend, hat sich aber bisher weder beweisen noch widerlegen lassen.

Tumorgärung und ungeregeltes Wachstum

Die *anaerobe* Gärung der Tumorzellen ist für alle Tumoren nahezu gleich groß. Die aerobe Gärung der Tumorzellen jedoch ist ungleich. Sie ist um so größer, je virulenter die Krebszellen sind, je schneller und destruktiver sie wachsen.

Dies spricht dafür, daß die Regelung des Wachstums im Körper durch einen Mechanismus ausgeübt wird, der mit der Sauerstoffatmung zusammenhängt. Dann würde man verstehen, warum die Tumoren ungeregelt wachsen: weil sie über eine Energiequelle verfügen, die dieser Regelung nicht unterworfen wäre.

Anwendungen auf die Medizin

Da die aerobe Gärung der Tumoren eine latente Stoffwechselkomponente der normalen wachsenden Körperzellen ist, so spricht der Stoffwechsel der Tumoren nicht zugunsten eines körperfremden in den Krebszellen lebenden Erregers. Im Gegenteil, es ist das Ergebnis der Arbeiten über den Stoffwechsel der Tumoren, daß Krebs eine Infektion mit körpereigenen Zellen ist, die aus normalen Körperzellen durch chronische Schädigung entstanden sind.

Stimmt man dieser Schlußfolgerung zu, so weiß man, was man zur Bekämpfung des Krebses zu tun hat. Zweifellos wird man den Krebs auf einen Bruchteil seines heutigen Vorkommens vermindern können, wenn man darauf bedacht ist, chro-

nische Schädigungen von den Körperzellen fernzuhalten. Zum Beispiel wird man vor dem Inhalieren von Zigarettenrauch warnen müssen; man wird die Dieselöldämpfe von den Straßen verbannen müssen; man wird das Räuchern von Lebensmitteln nur mit bestimmten Raucharten zulassen dürfen; man wird Lebensmittel nicht mehr mit Anilinfarbstoffen färben; man wird Lebensmittel nicht mehr mit Antiseptika konservieren, die zwar Bakterien, aber erst recht die Körperzellen schädigen; und man wird noch vieles andere tun müssen, was man mit dem nötigen Nachdruck so lange nicht zun konnte, als man „nicht wußte, was der Krebs ist".

Chemotherapie

Schließlich, wie steht es mit der Chemotherapie? Bedenkt man, daß die Krebszellen durch Schädigung aller Art aus normalen Körperzellen entstehen, so wird man die Chancen nicht für groß halten, Substanzen zu finden, die selektiv Krebszellen schädigen. Aber das heroische Zeitalter der Medizin, das gegen alle Chancen den Sieg im Kampf gegen die Bakterien errungen hat, läßt sich durch Bedenken nicht schrecken. Krebs, dessen Ursprungsgewebe mit Sexualfunktionen zu tun hat, kann, wie Charles Huggins zeigte, durch Sexualhormone beeinflußt werden. So fand Huggins, daß man menschlichen Prostata-Krebs zum Stehen, sogar zum Verschwinden bringen kann, wenn man im Körper die männlichen Sexualhormone durch weibliche verdrängt; und daß man Mammakrebs hemmen kann, wenn man umgekehrt die weiblichen Sexualhormone durch männliche verdrängt. Gerhard Domagk[11] hat vor kurzem gezeigt, daß man mit Chinonen Rattentumoren zum Verschwinden bringen kann. Vielleicht hat Dogmagk damit den Weg zu einer allgemeinen Chemotherapie der Tumoren eröffnet. Wenn Anaerobier bereits durch Luftsauerstoff abgetötet werden, wenn Krebszellen gegen höhere Sauerstoffdrucke merklich empfindlicher sind als normale Körperzellen, so könnte man verstehen, daß Krebszellen, wegen ihrer anaeroben Stoffwechselkomponente, gegen oxydierende Substanzen empfindlicher wären als normale Körperzellen.

Literatur

1 Warburg, O., Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.
2 Warburg, O., und Hiepler, Ernst, Z. Naturforschg. 7b (1952), 193.
3 Davis, J. G., Biochem. Z. 265 (1933), 90; 267 (1933), 357.
4 Goldblatt, Harry, and Cameron, Gladys, J. Exp. Med. 97 (1953), 525.
5 Cameron, G., Tissue Culture Technique. New York. Academic Press 1951.
6 Kubowitz, F., und Ott, P., Biochem. Z. 314 (1943), 94.
7 Warburg, O., Gawehn, K., und Lange, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 109.
8 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 314 (1943), 399.
9 Sibley, J. A., and Lehninger, A. L., J. Nat. Canc. Inst. 9 (1949), 303.
10 Baker, R., and Dovan, G., Cancer Res. 13 (1953), 141.
11 Domagk, Gerhard, Vortrag bei dem Treffen der Nobelpreisträger in Lindau 1954. Warburg, O., Arch. Geschwulstforschg. 6 (1953), 7.

28 Katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts auf den Energieumsatz bei der Photosynthese*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl und Walter Schröder

In blaugrünem Licht entsteht in Chlorella aus einem Proferment ein Ferment der Photosynthese, das bei Fortnahme des blaugrünen Lichts wieder zu Proferment zurückgebildet wird. Voraussichtlich wird sich aus diesen Versuchen eine Methode entwickeln, um aus der Wirkung verschiedenfarbigen Lichts das Absorptionsspektrum eines Photosynthese-Ferments zu bestimmen.

Kompensiert man die Atmung von Chlorella durch weißes Licht und entwickelt dann weiteren Sauerstoff durch monochromatisches grünes oder rotes Licht, so ist die Energieausbeute, bezogen auf das monochromatische Licht, sehr gut. Die Atmung kann dabei durch das monochromatische Licht mehrfach überkompensiert werden und die Versuche können beliebig lange ausgedehnt werden; während monochromatisches Licht *ohne* das weiße Kompensationslicht gute Energieausbeuten nur für niedrige Licht-Intensitäten und kurze Versuchszeiten ergab. Die Kompensationsmethode, nach dem Vorbild der elektro-physikalischen Meßmethoden entwickelt[1], war also ein großer methodischer Fortschritt in der Energetik der Photosynthese.

Trotzdem haben wir immer wieder versucht, ob es nicht möglich ist, auf das weiße Kompensationslicht zu verzichten. Aber je reiner unser monochromatisches Licht wurde, um so schlechter wurden, bei langen Versuchen, unsere Ausbeuten. Sie waren merkwürdigerweise im Winter oft schlechter als im Sommer. Im vergangenen Winter hatten wir Zellen in Händen, die in reinem monochromatischem Licht der Wellenlänge 644 mμ sogar in kurzen Zeiten nicht mehr imstande waren, Sauerstoff zu entwickeln. So wurde es notwendig, die Wirkungsweise des weißen Lichts näher zu untersuchen[2].

Wir fanden, daß es nicht notwendig war, mit dem weißen Licht die Atmung vollständig zu kompensieren. Sehr wenig weißes Licht genügte bereits, um die Ausbeute im Grün oder Rot zu verbessern; und von diesem wenigen weißen Licht war nur ein kleiner Teil, vor allem der blaugrüne Teil des Spektrums, wirksam, das ist derjenige Spektralteil, in dem die gelben Farbstoffe stark absorbieren. Tatsächlich genügte von dem Licht der blaugrünen Cadmiumlinien so wenig, daß es energetisch gegen das grüne oder rote Meßlicht nicht in Betracht kam.

Die Wirkung des blaugrünen Lichts tritt bei Zusatz des Lichts allmählich auf und verschwindet bei Fortnahme des blaugrünen Lichts wieder allmählich. Blaugrünes Licht ist also hierbei nicht direkt an der Photosynthese beteiligt, sondern durch Erzeugung einer zur Photosynthese notwendigen Substanz, die bei Fortnahme des blaugrünen Lichts allmählich wieder verschwindet (Abb. 1). Nennen wir diese Substanz ein Ferment, weil sehr wenig blaugrünes Licht sehr große photochemische Umsätze erzeugt, so haben wir in blaugrünem Licht die reversible photochemische Reaktion

$$\text{Proferment} \underset{\text{ohne Blaugrün}}{\overset{\text{mit Blaugrün}}{\rightleftharpoons}} \text{Ferment} \qquad [1]$$

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 9b (1954): 667.

in der die Geschwindigkeit der Rückreaktion variieren mag und in „Winterzellen" größer sein mag als in „Sommerzellen".

Von der Reaktion [1] ist ferner zu sagen, daß sie eine durch Schwermetall katalysierte Reaktion ist. Denn Blausäure, in der äußerst kleinen Konzentration von $n/350000$, hemmt die Wirkung des blaugrünen Lichts vollständig.

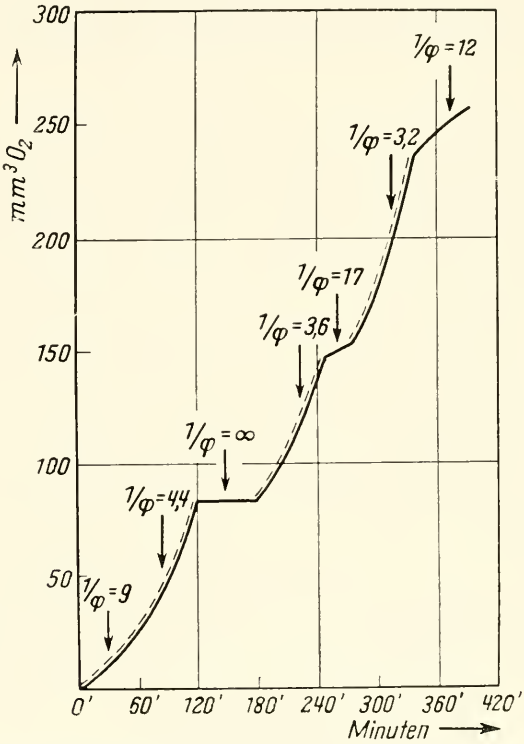


Abb. 1. Wirkung von blaugrünem Licht auf die Photosynthese. ——— Belichtung mit 644 mμ, J = 16,7 mm³ Quanten pro Minute. — — — — Belichtung mit Blaugrün, J = 0,3 mm³ Quanten pro Min. $1/\varphi$ = Mole Quanten absorbiert/Mole O_2 entwickelt. Wenn $1/\varphi$ = 3 ist, beträgt im Rot der Gewinn an chemischer Energie etwa 90%.

Das Endprodukt der Reaktion [1], das Ferment, ist in demjenigen Teilvorgang der Photosynthese wirksam, in dem die Kohlensäure reduziert wird. Denn bei Zusatz des blaugrünen Lichts steigt zuerst die CO_2-Aufnahme und erst später die O_2-Entwicklung; und bei Fortnahme des blaugrünen Lichts sinkt zuerst die CO_2-Aufnahme und erst später die O_2-Entwicklung.

Von der Ausgangssubstanz der Reaktion [1], dem Proferment, nehmen wir wegen des Wirkungsspektrums an, daß es ein Carotinoid ist. Statt [1] schreiben wir also

$$\text{Carotinoid} \underset{\text{ohne Blaugrün}}{\overset{\text{mit Blaugrün}}{\rightleftharpoons}} \text{Lumino-Carotinoid} \qquad [2]$$

Zugunsten dieser Gleichung spricht die lange bekannte Tatsache, daß Carotinoide durch Licht isomerisiert werden können, eine Eigenschaft, von der die

lebende Natur im Sehprozeß Gebrauch macht. Wie GEORGE WALD entdeckt hat[2a], ist der Sehpurpur ein Carotinoid und beruht die Ausbleichung des Sehpurpurs auf einer reversiblen Carotinoid-Isomerisierung.

Wir vergessen dabei nicht, daß zu den im Blaugrün absorbierenden Farbstoffen der Chlorella auch Flavine gehören. Aber dem Entdecker der Flavine, insbesondere des Luminoflavins[2b], sind keine reversiblen photochemischen Flavinreaktionen bekannt, die hier als Modellreaktionen angeführt werden könnten.*

1. Versuchsanordnung

Chlorella, suspendiert in ihrem Kulturmedium, dessen pH 4 bis 5 ist, wurde in Manometriegefäßen gemäß den neuen Vorschriften[3] kontinuierlich mit dem monochromatischen „Meßlicht" belichtet. Als Lichtquellen dienten Quecksilberhochdrucklampen *mit* oder *ohne* Cadmiumzusatz, aus deren Strahlung mit Blenden, Linsen, Farbfiltern, Interferenzscheiben und teil-durchlässigen Spiegeln zwei fast parallele Strahlen gewonnen wurden, deren Intensität bolometrisch gemessen und bolometrisch auf gleiche Intensität justiert wurde. Der von den Zellen absorbierte Bruchteil des eingestrahlten Lichts wurde mit Hilfe der Ulbrichtschen Kugel gemessen[4], in der die Manometriegefäße, vor Beginn der manometrischen Messungen, wie bei den manometrischen Messungen bewegt wurden.

Die Zelldichte war so klein, daß nicht mehr als 50% des eingestrahlten Lichts, meistens aber wesentlich weniger, in den Manometriegefäßen absorbiert wurde. Das Meßlicht war so stark, daß die Atmung der Zellen vernachlässigt werden konnte. Es wurde also, gemäß unsern neuen Vorschriften, nur der Überschuß der Photosynthese über die Atmung gemessen, d. h. der tatsächlich aus den Zellen entwickelte Sauerstoff; daraus und aus dem absorbierten Licht wurde der Quantenbedarf

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Mole Quanten absorbiert}}{\text{Mole } O_2 \text{ entwickelt}}$$

berechnet.

Außer den Quellen des Meßlichts war eine zweite Lichtquelle für das katalysierende Licht notwendig. Als solche diente ein 60-Watt-Cadmium-Leuchtrohr der Firma Heraeus-Hanau, das als „Jupiterlampe" in den Handel gebracht wird und das, abgedeckt durch ein Blauglas, in 1 m Abstand von den Manometriegefäßen aufgestellt wurde. Die durch das Blauglas durchgehenden Cadmiumlinien (441) 468, 480 und 509 mμ belichteten dann diffus die Zellen in den Manometriegefäßen. In den 5 bis 7 Stunden dauernden Versuchen wurde mit dem Meßlicht kontinuierlich belichtet, während das katalysierende Licht in Abständen von ganzen oder halben Stunden zugesetzt und wieder fortgenommen wurde.

Die Intensität des katalysierenden Lichts wurde aktinometrisch gemessen, indem in den Manometriegefäßen die Zellsuspensionen durch aktinometrische Flüssigkeit gleichen Volumens ersetzt wurde. Die eingestrahlte blaugrüne Inten-

---

* *Zusatz 1961.* Flavin-Mononukleotid ist nach unsern neuen Versuchen *im Licht* ein äußerst wirksamer Oxydationskatalisator, z. B. in dem System Ascorbinsäure, gelöst in m/100 Phosphat pH 7, wo es die Dehydrierung in Dehydro-Ascorbinsäure bewirkt.

sität wurde so im Mittel gleich 0,3 mm^3 Quanten pro Minute gefunden, während die eingestrahlte Intensität des Meßlichts 10 bis 170 mm^3 Quanten pro Minute betrug (1 μMol Quanten = 22,4 mm^3).

2. Die Reinheit der Spektralbezirke

Da sehr wenig blaugrünes Licht zur Erzeugung der katalytischen Wirkung genügt, war hier besonders darauf zu achten, daß das Meßlicht frei von blaugrünem Licht war.

Das Meßlicht 644 mμ erhält man hinreichend rein aus dem Licht der Cadmium-Quecksilber-Hochdrucklampe mit Hilfe einer Interferenzscheibe, in Verbindung mit einem Rotglas von Schott. Zur Gewinnung des Meßlichts 546 mμ darf keine Cadmium-Quecksilberlampe, sondern soll eine Quecksilberlampe mit möglichst reiner Quecksilberfüllung verwendet werden. Auch in dem Licht solcher Lampen sahen wir oft eine Linie um 510 mμ. Seit 1954, seit die spektrale Reinheit für uns von entscheidender Bedeutung geworden ist, entfernen wir 510 mμ, indem wir das früher vorgeschriebene Orangeglas 4 durch das Orangeglas 1 von Schott ersetzen. Zur Gewinnung des Meßlichts 436 mμ sollten gleichfalls nur Lampen mit Quecksilberfüllung, ohne Cd-Zusatz, verwendet werden. Die Entfernung von 510 mμ kann nicht mit einem Blauglas allein bewerkstelligt werden, sondern es muß eine Interferenzscheibe zu dem Blauglas hinzugefügt werden. — Näheres über die Meßlicht-Filter findet man in den speziellen Protokollen.

3. Die Lichtabsorption der gelben Farbstoffe

1923 haben wir mit dem König-Martensschen Spektralphotometer für verschiedene Wellenlängen gemessen[5], welcher Bruchteil des Lichts in einem methylalkoholischen Chlorella-Extrakt von den gelben Farbstoffen absorbiert wird. Zur Abtrennung des Chlorophylls aus dem Farbstoffgemisch bedienten wir uns dabei der Methode von Willstaetter, bei der das Chlorophyll zu Chlorophyllinen verseift und dadurch wasserlöslich gemacht wird. Wir haben die Messungen für unsern heutigen Chlorellastamm wiederholt und, dieses Mal mit lichtelektrischer Absorptionsmessung, die in Tab. 1 angeführten Werte gefunden.

Wellenlänge [mμ]	1923 nach König-Martens [%]	1954 lichtelektrisch [%]
644	0	0
546	fast 0	0
480	45	48
436	31	29

Tab. 1. Prozentualer Anteil der gelben Farbstoffe an der Lichtabsorption.

4. Das Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum des katalysierenden Lichts liegt noch nicht vor. Wir können nur soviel sagen, daß 644 mμ und 546 mμ unwirksam sind und daß 436 mμ

wahrscheinlich wesentlich schwächer wirkt als die blaugrünen Cadmium-Linien. Die blaugrünen Cadmium-Linien haben wir noch nicht getrennt untersucht.

5. Der Chlorophyllgehalt

Bei Messungen der Ausbeuten ist darauf zu achten, daß der Chlorophyllgehalt der Chlorella nicht zu hoch ist, da man bei hohen Chlorophyllgehalten schlechtere Ausbeuten erhält. Ein Anfangschlorophyllgehalt von etwa 4%, der im Lauf der Versuche auf 4,5% steigen mag, ist erlaubt. Solche Chlorophyllgehalte hatten unsre 24stündigen Kulturen, wenn die Zelldichte etwa 1 mm^3 pro cm^3 betrug. Bei längerer Kulturdauer stieg der Chlorophyllgehalt bis in die Nähe von 8%. Da der Chlorophyllgehalt der Grana ein Mehrfaches davon betragen muß, ist vielleicht bei hohen Chlorophyllgehalten ein Teil des Chlorophylls als „Reservechlorophyll" nicht an der Photosynthese beteiligt.

6. Der photosynthetische Umsatz

Durch wenig Zellen, große Lichtintensitäten und lange Versuchsdauer wurde erreicht, daß die photosynthetischen Umsätze pro Zelle in der Versuchszeit sehr groß waren. In der Tat waren sie so groß, daß aus gravimetrischen Gründen als einzige Energiequelle die absorbierte Lichtenergie in Betracht kam.

Für die so gewonnene größere Sicherheit der Ausbeute-Berechnungen mußte etwas von der Einfachheit der Versuche geopfert werden. Bei langen Versuchen mit großen Umsätzen nimmt mit dem Chlorophyllgehalt die Lichtabsorption zu, und so genügte es nicht, die Lichtabsorption am Anfang der Versuche zu messen, sondern sie mußte auch am Ende gemessen werden. Die Lichtabsorptionen für die Zwischenzeiten wurden dann durch lineare Interpolation gefunden. Auch an die Konstanz der Lichtquellen, die alle an Spannungsgleichhaltern lagen, mußten bei den langen Versuchen größere Anforderungen gestellt werden; Versuche, bei denen sich die Lichtintensitäten während der Versuche wesentlich änderten, wurden verworfen.

7. Protokolle

In den Protokollen am Ende dieser Arbeit findet man genaue Angaben über die Kultur der Zellen, über die Isolierung der Wellenlängen und über die manometrischen Ablesungen, so daß jeder die Fehler beurteilen, die Ausbeuten aus den beobachteten Drucken und Lichtabsorptionen berechnen und die Versuche selbst wiederholen kann.

8. Ergebnisse

Ein Versuch mit Rot als Meßlicht, dessen Daten man in Protokoll III findet, ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Wie man aus der Abbildung sieht, beträgt nach Zusatz von blaugrünem Licht der Quantenbedarf nach 2 Stunden 4,4, das entspricht einer Ausbeute an chemischer Energie von 60%. Wurde dann das Blaugrün fortgenommen, so stieg der Quantenbedarf alsbald auf unendlich, d. h. die Energie-

ausbeute sank auf Null. Wurde dann das Blaugrün wieder zugegeben, so sank der Quantenbedarf auf 3,6, d. h. die Energieausbeute stieg auf 75%. Wurde dann das Blaugrün wieder fortgenommen, so stieg der Quantenbedarf auf 17, d. h. die Energieausbeute sank auf 16%. Wurde dann das Blaugrün wieder zugegeben, so sank der Quantenbedarf auf 3,2, d. h. die Energieausbeute stieg auf 83%. Wurde dann das Blaugrün wieder fortgenommen, so stieg der Quantenbedarf auf 12, d. h. die Energieausbeute sank auf 22%. Im ganzen war also die Ausbeute an chemischer Energie bei Abwesenheit von Blaugrün sehr schlecht und wurde bei Zusatz von Blaugrün sehr gut. Würde man, was wir nicht getan haben, den veratmeten O_2 zu dem durch das Licht entwickelten O_2 addieren, so würde man für die beiden letzten Blaugrün-Perioden im Mittel einen Quantenbedarf von 2,85 finden, was einer Ausbeute an chemischer Energie von 93% der absorbierten Lichtenergie entsprechen würde.

Weiterhin beachte man in der Abbildung den zeitlichen Verlauf der Zunahmen oder Abnahmen der Photosynthese bei Zugabe oder Fortnahme des blaugrünen Lichts — ein Verhalten, das für die Deutung der Versuche wesentlich gewesen ist.

Ein entsprechender Versuch mit Grün als Meßlicht ist in Protokoll II mit allen experimentellen Daten mitgeteilt.

9. Der Quotient CO_2/O_2

Bei dem allmählichen Auftreten und Verschwinden der Wirkung des blaugrünen Lichts ist stets das erste, was man sieht, eine Änderung des Quotienten CO_2/O_2. Nimmt man das Blaugrün fort, so sinkt zunächst die CO_2-Aufnahme und erst dann sinkt die O_2-Entwicklung. Setzt man das Blaugrün zu, so steigt zuerst die CO_2-Aufnahme und erst dann steigt die O_2-Entwicklung. Zum Beleg diene die folgende Tabelle, die aus den Daten der Protokolle II und III zusammengestellt ist (s. Tab. 2).

Meßlicht 644 mμ				Meßlicht 546 mμ			
Blaugrün	Zeit [min]	$1/\varphi$ = Quanten/O_2	CO_2/O_2	Blaugrün	Zeit [min]	$1/\varphi$ = Quanten/O_2	CO_2/O_2
							— 1.14
+	60	9.4	— 1.0	+	30	4.66	— 1.22
+	65	4.4	— 1.16	+	30	4.20	— *1.04*
—	60	∞	*0*	—	30	6.6	— *0.84*
+	40	5.8	— 1.0	—	30	8.8	— *0.65*
+	30	3.6	— 1.19	—	30	10.6	— 1.11
—	30	17	— *0.31*	+	30	5.6	— 1.16
+	30	4.06	— 1.19	+	60	4.7	
+	30	3.15	— 1.23	+	30 }	4.0	— 1.23
—	30	7.8	— *0.91*	+	30 }		
—	30	12.2	— *0.69*	+	15 }	5.5	— 1.19
				+	15 }		
				—	15	10.3	— *0.89*
				—	15	25	— *0.17*

Tab. 2. Zusammengestellt aus Daten der Protokolle II und III.

Wir erinnern uns dabei an das Modell der Reduktion der CO_2[6], bei dem die CO_2 von Pentosephosphat unter Bildung von Hexonsäurephosphat aufgenommen wird und bei dem dann das Hexonsäurephosphat zu Glucosephosphat reduziert wird. Beim ersten Schritt wird die CO_2 zur Stufe der Ameisensäure reduziert, beim zweiten Schritt wird sie zur Stufe von Kohlenhydrat reduziert. Jeder der beiden Schritte verbraucht 2 Atome H, entwickelt also ein halbes Molekül O_2, so daß also CO_2/O_2 für den ersten Schritt gleich 2 und für den zweiten Schritt gleich 0 ist. Das von dem blaugrünen Licht erzeugte Ferment würde also, da es primär die CO_2-Aufnahme hemmt, ein Ferment sein, das die erste Stufe der CO_2-Reduktion bewirkt.*

10. Blaugrün und Blau als Meßlicht

Wegen der katalytischen Wirkung des blaugrünen Lichts war es interessant, Blaugrün auch als stöchiometrisches Meßlicht zu prüfen.

Wir fanden (Protokoll IV) einen mittleren Quantenbedarf von 6,5. Dieser Quantenbedarf ist etwa doppelt so groß wie im Rot oder Grün unter Zusatz von wenig Blaugrün. Bedenken wir, daß im Blaugrün die Hälfte des Lichts von den gelben Farbstoffen absorbiert wird, so war der Quantenbedarf für das von dem Chlorophyll absorbierte Licht

$$1/\varphi = 6{,}5 \cdot 0{,}5 = 3{,}25,$$

also ebenso groß wie der Quantenbedarf im Rot oder Grün.

Ein ähnliches Ergebnis erhielten wir für 436 mμ als Meßlicht, von dem die gelben Farbstoffe 30% absorbieren. Wir fanden (Protokoll V), auf die Gesamtabsorption bezogen, im Mittel

$$1/\varphi = 5{,}3,$$

und nur auf die Chlorophyllabsorption bezogen,

$$1/\varphi = 5{,}3 \cdot 0{,}7 = 3{,}7,$$

also wiederum nahezu dasselbe wie für rotes oder für grünes Meßlicht.

Wenn wir 1923 fanden[5], daß der Quantenbedarf im Rot und im Gelb 4,4, im Blau aber, bezogen auf die Gesamtabsorption, 5,1 war, so könnte man dies jetzt durch die Annahme erklären, daß im Rot und Gelb das katalysierende Licht zur Erzielung der maximalen Ausbeute fehlte. Bezogen auf die Chlorophyllabsorption betragen die Werte von 1923 im Rot und im Gelb $1/\varphi = 4{,}4$, im Blau aber $1/\varphi = 5{,}1 \cdot 0{,}7 = 3{,}6$.

Es ist also nunmehr, nach der Entdeckung der katalytischen Wirkung des blaugrünen Lichts, zweifelhaft geworden, ob die von den gelben Farbstoffen absorbierte Lichtenergie auch zur Reduktion der Kohlensäure oder ob sie nur zur Bildung des Luminoferments benutzt wird.

11. Sommerzellen

Die katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts wurde im Januar dieses Jahres entdeckt. In einer fast ununterbrochenen Versuchsserie bis Ende Juli wurde diese Wirkung immer wieder gefunden, mit Ausnahme einer Periode von 3 Wochen im

* *Zusatz 1961.* Dieser Absatz ist heute zu streichen. Er ist noch ein Tribut an den Irrtum, daß der chemische Mechanismus die Umkehr des Mechanismus der Atmung ist.

Juni. Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß die im Jahre 1953 veröffentlichten Versuche[3], bei denen in monochromatischem Rot, ohne Kompensation durch weißes Licht, gute Ausbeuten erhalten wurden, nach Ausweis der veröffentlichten Protokolle, Mitte Mai und Ende Juni ausgeführt worden sind; und daß die im Jahre 1953 veröffentlichten Versuche, bei denen im Grün, ohne Kompensation mit weißem Licht, gute Ausbeuten erhalten wurden, zwar im März ausgeführt worden sind, aber mit Grün, das mit Orangeglas 4 isoliert war und deshalb noch 510 mμ als Verunreinigung enthielt. —

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, erklären wir die Unterschiede zwischen den Sommer- und Winterzellen — bei gleichen spektralen Reinheiten des Meßlichts — durch die Annahme, daß die Rückbildung des Lumino-Carotinoids zu Carotinoid in den Sommerzellen langsamer verläuft.

12. Hemmung durch $n/350000$-HCN

Autotrophe Chlorella gehört zu denjenigen Organismen, deren Atmung durch HCN nicht spezifisch gehemmt wird[7]. Es mag sein, daß HCN in Chlorella verbrennt. Aber diese Verbrennung ist jedenfalls eine sehr langsame, da der respiratorische Quotient CO_2/O_2 der Chlorellaatmung, der um — 1 ist, sich bei Zusatz von HCN, deren Verbrennungsquotient $CO_2/O_2 = -2$ ist, nicht ändert.

Anders als die Atmung ist die Photosynthese[7] der Chlorella in weißem Licht gegen HCN sehr empfindlich und wird durch $n/20000$-HCN um 50% gehemmt.

Noch viel empfindlicher gegen HCN ist, wie wir fanden, die Wirkung des blaugrünen Lichts, die bereits durch $n/350000$-HCN vollständig gehemmt wird.

Bei den Versuchen war darauf zu achten, daß die Zellsuspensionen in den Manometriegefäßen zuerst mit den vorgeschriebenen Gasmischungen gesättigt wurden und daß erst dann die HCN zugesetzt wurde, da andernfalls die zugesetzte HCN schon vor Beginn der Versuche wieder ausgetrieben worden wäre. Zu 7 cm³ Zellsuspensionen in Kulturlösung, enthaltend 8 mm³ Zellen, setzten wir 0,2 cm³ 10^{-4} n-HCN und belichteten mit der Wellenlänge 644 mμ als Meßlicht ($\mathcal{J} = 23$ mm³ Quanten pro Minute) unter Zusatz oder Fortnahme von Blaugrün ($\mathcal{J} = 0{,}3$ mm³ Quanten pro Minute). In einem Versuch am 16. Juli dieses Jahres fanden wir:

$\frac{n}{350\,000}$ HCN				Ohne HCN			
Blaugrün	Zeit [min]	$1/q$	CO_2/O_2	Blaugrün	Zeit [min]	$1/q$	CO_2/O_2
—*	60	11	— 1.04	—	60	16	— 0.44
+**	85	10	— 1.13	+	30	10	— 0.76
+	90	14	— 0.96	+	90	5.9	— 1.02
	Nach Entfernung der HCN durch Gasdurchleitung			+	120	4.8	— 1.11
				—	30	9.1	— 0.84
				—	30	8.8	— 0.89
+	30	9.0	— 0.98				
+	30	5.7	— 1.18				
+	30	4.9	— 1.30				

* (—) = ohne, ** (+) = mit

Wenn also die Ausbeute durch Mangel an Blaugrün schlecht geworden war, so konnte sie in $n/350000$-HCN durch Zugabe von Blaugrün nicht wieder verbessert werden, während die Ausbeute nach Entfernung der HCN oder in einer von Anfang an blausäure-freien Kontrolle derselben Zellkultur bei Zugabe von Blaugrün allmählich wieder anstieg.

Aus derartigen Versuchen folgt, daß an der Fermentbildung durch blaugrünes Licht ein Schwermetall beteiligt ist. Aus dem folgenden Abschnitt ergibt sich, daß dieses Schwermetall in einem festen Komplex gebunden sein muß.

13. $n/35000$-α-α'-Phenanthrolin

Während HCN sowohl mit festen Schwermetallkomplexen (wie Haeminen) reagiert, als auch, bei neutraler und alkalischer Reaktion, mit freien Schwermetall-Ionen, reagiert α-α'-Phenanthrolin nicht mit festen komplexen, sondern nur mit freien Schwermetall-Ionen, und zwar in sauren wie in neutralen Lösungen. Phenanthrolin ist also das Reagenz auf freie Schwermetall-Ionen oder lose gebundene Komplexe, denen es die Schwermetall-Ionen entziehen kann.

$n/35000$-Phenanthrolin hemmt bei pH 5 die Photosynthese in Chlorella um etwa 33%. Die 67% Photosynthese, die übrig bleiben, reagieren auf blaugrünes Licht genau wie Zellen derselben Kultur, denen kein Phenanthrolin zugesetzt worden ist. Zu 7 cm³ Zellsuspension in Kulturlösung, die 5 mm³ Zellen enthielten, gaben wir 0,2 cm³ $n/1000$ salzsaures Phenanthrolin und belichteten mit der Wellenlänge 644 mμ als Meßlicht ($\mathcal{J}$ = 27 mm³ Quanten pro Minute) unter Zusatz und Fortnahme von Blaugrün ($\mathcal{J}$ = 0,3 mm³ Quanten pro Minute). Wir fanden in einem Versuch am 20. Juli dieses Jahres:

Ohne Phenanthrolin			in $\frac{n}{35000}$ Phenanthrolin		
Blaugrün	Zeit [min]	$1/\varphi$	Blaugrün	Zeit [min]	$1/\varphi$
+	60	4.1	+	90	6.3
+	60	4.2	—	60	8.2
—	60	7.1	—	60	10.2
—	60	7.0	+	30	7.6
+	60	4.5	+	30	6.5

Wenn also, in $n/35000$-Phenanthrolin, die Ausbeute durch Mangel an Blaugrün schlecht geworden ist, kann sie, anders als in HCN, durch Zusatz von Blaugrün wieder verbessert werden. Es folgt daraus, daß in der Fermentkette der Photosynthese mindestens 2 Schwermetalle mitwirken, eine feste Komplexverbindung, die mit HCN, aber nicht mit Phenanthrolin reagiert, und lose gebundene oder freie Schwermetall-Ionen, die mit Phenanthrolin reagieren.

Protokoll I. Allgemeines

Chlorella: Pyrenoidosa. Stamm von Professor *Harder*, Göttingen.

Kulturlösung K: 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 2 g NaCl + 2 g KNO_3 + 1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 1000 cm³ aus Quarz dest. Wasser. pH ist etwa 4,2 und geht bei der Kultur auf etwa 5,2.

Mikroelemente nach D. Arnon:

I: 500 mg $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 1000 mg $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\,H_2O$ + 300 mg HBO_3 + 200 mg $MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$ + 22 mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 8 mg $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mg $(NH_4)_6\,Mo_7\,O_{24}$ + $4H_2O$ + 1000 $cm^3 \frac{n}{200}$-H_2SO_4.

II: 5 mg $CoSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 5 mg $NiSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 5 mg Na_2WO_4 + 5 mg CrK $(SO_4)_2 \cdot 12\,H_2O$ + 5 mg $VOSO_4 \cdot 2H_2O$ + 1000$cm^3 \frac{n}{200}$-H_2SO_4.

III*: 500 mg $VOSO_4 \cdot 2\,H_2O$ + 500 cm^3 Wasser (0,1 cm^3 = 0,27 μg Vanadium).**

Vor der Beimpfung der Zuchtkolben werden je 2 cm^3 I + 1 cm^3 II + 0,1 cm^3 III zu 250 cm „K" gegeben.

Anordnung der Kultur: Abbildung in: *Warburg* und *Mitarbb.*, diese Zeitschrift 7b, 142 (1952) (dort aber andere Kulturlösung).

Temperatur bei der Kultur: 25°C.

Bei der Kultur durchgeleitetes Gas: 5 Vol% CO_2, 10 Vol% O_2, Rest Argon.

Belichtung: Südfenster mit Sonnenschutz. 200-Watt-Metallfadenlampe in etwa 25 cm Abstand von den Zuchtkolben.

Vermehrung: Einsaat etwa 30 mm^3, Ernte nach 24 Stdn. 200 bis 250 mm^3, nach 48 Stdn. 500 bis 800 mm^3 Zellen.

Vorbereitung zum Versuch: 1tägige Kulturen wurden direkt verwendet, 2- oder mehrtägige Kulturen wurden 2mal auf der Zentrifuge mit „K"-Lösung gewaschen. Die Zelldichte wurde in Haematokriten bestimmt und gab einen ungefähren Anhaltspunkt für die Menge der Versuchszellen. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0,25 erhält man aus dem Zellvolumen in „K" die Trockensubstanz.

Einfüllen in die Manometriegefäße: Je 7 cm^3 Zellsuspension mit etwa je 7 mm^3 Zellen wurden in zwei Gefäße von gleicher Form aber ungleichem Volumen eingefüllt. Dann wurde weiter nach den Vorschriften der 2-Gefäß-Methode verfahren.

Messung der Lichtabsorption: Die Lichtabsorption wurde in den bewegten Manometriegefäßen am Anfang und am Ende der Versuche mit der Ulbrichtschen Kugel gemessen und daraus die Lichtabsorption für die Zwischenzeiten durch lineare Interpolation berechnet. Näheres über die Kugel bei *Warburg* und *Krippahl*, diese Zeitschrift 9b, 181 (1954).

Die Lichtabsorption A als Funktion der Zellkonzentration c: Aus der Gleichung der Lichtabsorption in Lösungen,

$$A = \frac{i_0 - i}{i_0} = 1 - e^{-\beta \cdot c \cdot d}$$

folgt für kleine Werte von c

$$A = \beta \cdot c \cdot d,$$

d. h. bei kleinen Werten von c ist die Lichtabsorption proportional der Farbstoffkonzentration c, wenn der Lichtweg d konstant gehalten wird. In den Zellsuspensionen jedoch nimmt, wegen der Zerstreuung, der Lichtweg d mit der Zellkonzentration c zu, und deshalb findet man bei kleinen Zellkonzentrationen, daß dA/dc nicht konstant ist, sondern zunimmt.

Manometrie. Die Versuche waren so angeordnet, daß die Atmung vernachlässigt werden konnte. In der ganzen 5- bis 7stdg. Versuchszeit konnte also ohne Unterbrechung, ohne die Atmung zu messen, kontinuierlich mit dem Meßlicht belichtet werden. Der große methodische Fortschritt dieses Verfahrens ist in dieser Zeitschrift 8b, 675 (1953), erläutert. Auch wegen Bolometrie, Optik und Manometrie wird diese Arbeit und die Arbeit diese Zeitschrift 9b, 303 (1954) hier als bekannt vorausgesetzt.

Aktinometrie. Zur aktinometrischen Messung des diffusen blaugrünen Lichts wurden die Zellsuspensionen in den Manometriegefäßen durch je 7 cm^3 aktinometrische Flüssigkeit ersetzt, die die Zusammensetzung hatte: 2 mg Äthylchlorophyllid + 200 mg Thioharnstoff in 7 cm^3 Pyridin reinst von Merck. Wenn im Gasraum Luft war — was am bequemsten ist —, so wurden die absorbierten mm^3 O_2 durch 0,65 dividiert, um die mm^3 absorbierten Quanten zu erhalten. Vgl. auch *Warburg* und *Schocken*, Archives of Biochemistry 21, 363 (1949).

---

* Auf Grund der Mitteilung von D. *Arnon* in Nature (London) 172, 1039 (1953).

** *Zusatz 1961.* Es ist nicht $VOSO_4$, sondern $NaVO_3$, also Na-Meta-Vanadat, zu verwenden.

Chlorophyllbestimmung in Chlorella. Chlorella wurde in dest. Wasser gewaschen und dann mit trockenem Methanol extrahiert, bis der Rückstand nicht mehr rot fluoreszierte. Dann wurde die Lichtschwächung i_0/i für die Wellenlänge 546 mμ und den Lichtweg d [cm] bestimmt und daraus die Chlorophyllkonzentration c mit $\beta = 9{,}3$ cm^2/mg erhalten:

$$c = \frac{\ln \frac{i_0}{i}}{\beta \cdot d} = \frac{\ln \frac{i_0}{i}}{9{,}3 \cdot d} \left[\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}\right]$$

Protokoll II. Versuch vom 19. 2. 1954, λ 546 als Meßlicht ± Blaugrün

1tägige Kultur, Vermehrung von 40 → 250 mm^3. 7 cm^3 (= 7 mm^3 Zellen) in jedes Manometriegefäß eingefüllt. Anfangsabsorption 7,2%. Endabsorption nach 6-Stdn.-Versuch 11,5%. Blaugrün-Absorption etwa 50%.

20°. Gasraum 5 Vol. % CO_2, 10 Vol. % O_2, Argon.

$v' = 16{,}88$ cm^3 $\quad v = 21{,}35$ cm^3,

$v'_F = 7{,}00$ cm^3 $\quad v_F = 7{,}00$ cm^3.

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}05 - H \cdot 10{,}24 \text{ [mm}^3\text{]},$$

$$x_{CO_2} = -H' \cdot 11{,}49 + H \cdot 16{,}57 \text{ [mm}^3\text{]}.$$

J_{546} eingestrahlt [mm^3 Quanten pro Minute]	J blaugrün eingestrahlt [mm^3 Quanten pro Minute]	Zeit [min]	H' [mm positiv. Druck]	H [mm positiv. Druck]	$1/q$ = Quanten/O_2 [O]	γ = CO_2/O_2 [O]
93.5	0.3	30	+ 13	+ 6.0	*4.66	— 1.14
93.5	0.3	30	+ 13	+ 5.5	4.20	— 1.22
93.5	*0*	30	+ 12.5	+ 6.5	*6.6*	— *1.04*
93.5	*0*	30	+ 13.5	+ 8.0	*8.8*	— *0.84*
93.5	*0*	30	+ 13.5	+ 8.5	*10.6*	— *0.65*
93.5	0.3	30	+ 13.5	+ 6.5	5.6	— 1.11
93.5	0.3	60	+ 29.5	+ 13	4.7	— 1.16
49.8	0.3	30	+ 8.5	+ 3.5	4.0	— 1.23
49.8	0.3	30	+ 9.5	+ 3.5		
171	0.3	15	+ 13	+ 5.5	5.5	— 1.19
171	0.3	15	+ 14	+ 6.0		
171	*0*	15	+ 13	+ 7.5	*10.3*	— *0.89*
171	*0*	15	+ 11	+ 7.5	*25*	— *0.17*

* λ 546 mμ aus 500-Watt-Hg-Lampe mit 2 cm 20% $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$, 2 mm Orangeglas 1 (Schott), 20 mm Didymglas. Blaugrün: 60-Watt-Jupiterlampe + 2 mm B.G. 23 in 100 cm Entfernung von Manometrie-Gefäßen.

Protokoll III. Versuch vom 2. 4. 1954

λ 644 mμ als Meßlicht ± Blaugrün.

λ 644 mμ mit Interferenzfilter aus Cd-Hg-Lampe.

Blaugrün: 60-Watt-Jupiterlampe + 2 mm B.G. 23, 100 cm von den Manometrie-Gefäßen entfernt.

1-tägige Kultur. Vermehrung 30 → 250 mm^3. 7 cm^3 = 7 mm^3 Zellen in jedes Manometriegefäß eingefüllt. Anfangsabsorption für 644 mμ 22,4%, Endabsorption nach 6½ Stdn. 28,9%. Blaugrün-Absorption etwa 50%.

20°. Gasraum 10 Vol. % CO_2, 10 Vol. % O_2, Argon.

$v' = 16{,}88$ cm^3 $\quad v = 21{,}35$ cm^3,

$v'_F = 7{,}00$ cm^3 $\quad v_F = 7{,}00$ cm^3.

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}05 - H \cdot 10{,}24 \text{ [mm}^3\text{]},$$

$$x_{CO_2} = -H' \cdot 11{,}49 + H \cdot 16{,}57 \text{ [mm}^3\text{]}.$$

J_{644}	$J_{\text{blaugrün}}$	Zeit [min]	H'	H	$1/\varphi =$ Quanten/O_2	$\gamma =$ CO_2/O_2
eingestrahlt [mm³ Quanten pro Minute]			mm [positiv. Drucke]		[O]	
16.7	0.3	60	+ 10	+ 5.45	9.4	— 1.0
16.7	0.3	65	+ 17	+ 7.63	4.4	— 1.16
16.7	*0*	60	+ 12.5	+ 9.8	∞	*0*
16.7	0.3	40	+ 12.0	+ 6.55	5.8	— 1.0
16.7	0.3	30	+ 10.0	+ 4.36	3.6	— 1.19
16.7	*0*	30	+ 6.5	+ 4.36	*17*	— *0.31*
16.7	0.3	30	+ 9.0	+ 3.82	4.06	— 1.19
16.7	0.3	30	+ 11.0	+ 4.36	3.15	— 1.23
16.7	*0*	30	+ 8.5	+ 4.9	*7.8*	— *0.91*
16.7	*0*	30	+ 7.0	+ 4.36	*12.2*	— *0.69*

Protokoll IV. Versuch vom 25. 3. 1954

Blaugrün als Meßlicht ± Jupiterlampe. *Meßlicht:* Cd-Hg-Lampe 410 Watt, als Filter 2 cm 10% $CuSO_4$. 5 H_2O + 2 mm Blauglas 28 (Schott) + 2 mm Gelbglas 5 (Schott); oder an Stelle von Blauglas Guineagrünlösung 1 mg/cm³, 1 cm Schichtdicke. Ergibt Gemisch von 468 und 480 und 509 mμ, Mittel 487 mμ; $N_0 \cdot h \cdot \nu$ Mittel 58 200 cal.

Jupiterlampe: 60 Watt 100 cm, entweder mit Blauglas 23 (Schott) 2 mm oder mit Rotglas 2 (Schott) 2 mm. Ergibt 487 mμ (Mittelwert) oder 644 mμ. Beide J, eingestrahlt in Manometergefäße, etwa 0,3 mm³ Quanten pro Minute.

1tägige Kultur. Vermehrung 30 → 250 mm³ Zellen. 7 cm³ = 7 mm³ Zellen in jedes Manometergefäß eingefüllt. Anfangsabsorption für Meßlicht 29,8%, Endabsorption 38,3%.

J_{487}	$J_{\text{Jupiterlampe}}$	Zeit [min]	H'	H	$1/\varphi$	$\gamma =$ CO_2/O_2
eingestrahlt [mm³ Quanten pro Minute]			mm [positiv. Drucke]		[O]	
11.1	0.3; λ 487	60	+ 10.0	+ 5.0	6.2	— 1.10
20.3	0.3; λ 487	30	+ 9.5	+ 5.5	9.4	— 0.87
20.3	0.3; λ 487	30	+ 8.5	+ 4.0	7.0	— 1.11
20.3	0.3; λ 487	30	+ 8.5	+ 4.0	7.0	— 1.11
20.3	0.3; λ 644	100	+ 31.5	+ 13	5.7	— 1.21
5.9	0.3; λ 644	60	+ 5.0	+ 2.0	6.4	— 1.23
20.3	0.3; λ 644	30	+ 9.5	+ 4.0	6.3	— 1.21
20.3	0	30	+ 10.5	+ 4.0	5.3	— 1.24
20.3	0	30	+ 10.5	+ 4.0	5.3	— 1.24
					Mittel 6.5	

20°. Gasraum 10 Vol. % CO_2, 10 Vol. % O_2, Argon.

$$v' = 16{,}88 \text{ cm}^3 \qquad v = 21{,}35 \text{ cm}^3$$
$$v'_F = 7{,}00 \text{ cm}^3 \qquad v_F = 7{,}00 \text{ cm}^3.$$

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}05 - H \cdot 10{,}24 \text{ [mm}^3\text{]},$$
$$x_{CO_2} = - H' \cdot 11{,}49 + H \cdot 16{,}57 \text{ [mm}^3\text{]}.$$

Da bei λ 487 etwa 50% des Lichts von den gelben Farbstoffen absorbiert werden, ist der Quantenbedarf des vom Chlorophyll absorbierten Lichts

$$1/\varphi = 3{,}25.$$

Protokoll V. Versuch vom 1. 4. 1954

λ 436 mμ als Meßlicht $\pm$ Blaugrün.

λ 436 mμ: aus Cd-Hg-Lampe 410 Watt isoliert mit 2 cm 20% $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mm B.G. 12 (Schott) + Interferenzscheibe. Kein 405 mμ und nur Spuren Blaugrün.

Blaugrün: Jupiterlampe 60 Watt + 2 mm B.G. 23 (Schott), 100 cm von Manometergefäßen entfernt.

1tägige Kultur. Vermehrung 30 → 214 mm³ Zellen. 7 cm³ = 6 mm³ Zellen in jedes Manometergefäß eingefüllt. Anfangsabsorption λ 436 mμ 54,3% und Endabsorption nach 9½ Stunden. 65,6%. Blaugrün-Absorption etwa 50%.

20°. Gasraum 10 Vol. % CO_2, 10 Vol. % O_2, Argon.

$$v' = 16{,}88\ \text{cm}^3 \qquad v = 21{,}35\ \text{cm}^3,$$
$$v'_F = 7{,}00\ \text{cm}^3 \qquad v_F = 7{,}00\ \text{cm}^3.$$

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}05 - H \cdot 10{,}24\ [\text{mm}^3],$$
$$x_{CO_2} = -H' \cdot 11{,}49 + H \cdot 16{,}57\ [\text{mm}^3].$$

Da 34% der Wellenlänge 436 mμ von den gelben Farbstoffen und 66% von dem Chlorophyll absorbiert werden, so war der Quantenbedarf des von dem Chlorophyll absorbierten Lichts

$$1/\varphi = 5{,}3 \times 0{,}66 = 3{,}5.$$

J_{436} eingestrahlt [mm³ Quanten pro Minute]	J blaugrün eingestrahlt [mm³ Quanten pro Minute]	Zeit [min]	H' [mm positiv. Drucke]	H [mm positiv. Drucke]	$1/\varphi$ = Quanten/O_2 [O]	γ = CO_2/O_2 [O]
8.14	0.3	30	+ 8.0	+ 3.5		
8.14	0.3	30	+ 7.5	+ 3.5		
8.14	0.3	30	+ 7.5	+ 3.5	4.9	—1.07
8.14	0.3	30	+ 8.0	+ 3.5		
15.3	0.3	75	+ 31.0	+ 10		
15.3	0.3	30	+ 13.0	+ 6.0	4.9	—1.30
15.3	0.3	30	+ 13.5	+ 5.5		
7.9	0.3	30	+ 7.5	+ 3.5	5.7	—1.14
15.0	0.3	30	+ 14.5	+ 6.0		
15.0	0.3	30	+ 14.0	+ 6.0	5.1	—1.19
15.0	0.3	30	+ 14.5	+ 6.5		
14.7	0.3	215	+ 101.5	+ 46.5	5.8	—1.16
					Mittel 5.3	

Literatur

1 Warburg, O., und Burk, Dean, Arch. Biochemistry 25 (1950), 410.

2 Vorläufige Mitteilung Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., Buchholz W. und Theel, E., Z. Naturforschg. 9b (1954), 164.

2a Wald, G., Amer. Sientist 42 (1954), 73.

2b Warburg, O., und Christian, W., Naturwissenschaften 20 (1932), 980.

3 Warburg, O., Krippahl, G., Buchholz, W., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 8b (1953), 675.

4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.

5 Warburg, O., und Negelein, E., Z. physik. Chem. 106 (1923), 191.

6 Warburg, O., und Krippahl, G., Photosynthese-Fermente. Z. angew. Chemie 66 (1954), 493.

7 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.

29 Wirkungsspektrum eines Photosynthese-Ferments*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl und Walter Schröder

Durch Zusatz verschiedener Wellenlängen zu rotem Meßlicht wird das Wirkungsspektrum eines Photosynthese-Ferments erhalten.

Bringt man Chlorella — die in weißem Licht gezüchtet wird — in rotes Licht, so sinkt die Photosynthese bald ab; sie steigt wieder auf ihren Anfangswert an, wenn man dem roten Licht eine kleine, energetisch nicht in Betracht kommende Menge blaugrünen Lichts hinzufügt.[1] So kann man ohne Energieaufwand, also katalytisch, Photosynthese entstehen lassen und wieder zum Verschwinden bringen. Dabei ist es wichtig, daß beim Absinken der Photosynthese im roten Licht zuerst die CO_2-Aufnahme und erst dann die O_2-Entwicklung absinkt; und daß bei Zusatz des blaugrünen Lichts zuerst die CO_2-Aufnahme wieder erscheint. Das Luminoferment der Photosynthese, das bei Zusatz des grünen Lichts entsteht,

$$\text{Proferment} \underset{-\text{ blaugrün}}{\overset{+\text{ blaugrün}}{\rightleftarrows}} \text{Luminoferment,}$$

ist also an der Reduktion der Kohlensäure beteiligt.

Variiert man die Wellenlänge des katalysierenden Lichts und bestimmt die Quantenintensitäten gleicher Wirkung $\mathcal{J}_1$ und $\mathcal{J}_2$, so erhält man das Wirkungsspektrum des katalysierenden Lichts:

$$W_1/W_2 = \mathcal{J}_2/\mathcal{J}_1,$$

wo W_1 und W_2 die Wirkungsstärken der Wellenlängen 1 und 2 sind. Da aber gleiche Wirkung gleiche Quantenabsorption bedeutet, so ist das Wirkungsspektrum des katalysierenden Lichts gleich dem Absorptionsspektrum des Katalysators. Die Bestimmung dieses Spektrums (Abb. 1) wird im folgenden beschrieben. Auf Grund dieses Spektrums werden am Schluß dieser Arbeit zwei Carotinoid-Proteide genannt, die als Modelle des Photosynthese-Ferments dienen können: der Sehpurpur, dessen prosthetische Gruppe nach R. A. Morton Vitamin-A-Aldehyd ist, und Ooverdin, dessen prosthetische Gruppe nach Richard Kuhn ein doppeltes Diketol des β-Carotins ist.

1. Optische Versuchsanordnung

Die Wirkung des Lichts wurde manometrisch mit der 2-Gefäß-Methode bestimmt. In jedes Gefäß mußte gemessenes rotes Licht und gemessenes blaugrünes Licht eingestrahlt werden, so daß also 4 Lichtstrahlen erforderlich waren, die getrennt bolometrisch gemessen, aber zu 2 Paaren vereinigt in die Manometriegefäße eingestrahlt wurden. Wie dies mit Hilfe von 2 gewöhnlichen Spiegeln und einem teildurchlässigen Spiegel erreicht wurde, veranschaulicht Abb. 2.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955): 631.

Einer Erläuterung bedarf lediglich die bolometrische Justierung der beiden roten Strahlen und der beiden blaugrünen Strahlen auf gleiche Intensität. Zuerst wurden mit Hilfe der eingezeichneten Blenden die beiden roten Strahlen auf gleiche Intensität justiert. Dann waren, da der teildurchlässige Spiegel Rot anders

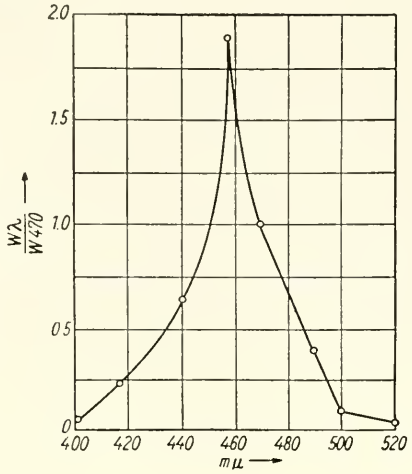


Abb. 1. Wirkungsspektrum eines Photosynthese-Ferments.

teilt als Blaugrün, die beiden blaugrünen Strahlen ungleich, die nunmehr, ohne daß die Blenden geändert werden durften, justiert werden mußten. Dies geschah mit Hilfe des eingezeichneten Trogs, der bei der Justierung des Rot mit reinem Wasser gefüllt war und dem zur Justierung des Blaugrün Chromat zugesetzt wurde, das Rot nicht absorbiert.

Als Lichtquelle für Rot diente eine 500-Watt-Metallfadenlampe (Schmalfilmlampe der Osram A.G.), aus der mit Rotscheibe und Interferenzfilter ein Bezirk um 645 mμ isoliert wurde. Lichtquelle für Blaugrün war eine 300-Watt-Xenon-

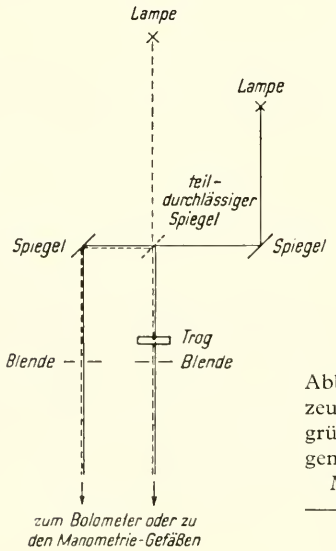


Abb. 2. Optische Versuchsanordnung zur Erzeugung von zwei roten und zwei blaugrünen Strahlen, die getrennt bolometrisch gemessen und zu Paaren vereinigt in die Manometriegefäße eingestrahlt werden.
——— Meßlicht, - - - - - katalytisches Licht.

Hochdrucklampe der Osram A. G., aus der auf entsprechende Weise die verschiedenen blaugrünen Bezirke isoliert wurden. In beiden Fällen befand sich zwischen Lampe und Filtern 5 cm fließendes Wasser und im Fall des Blaugrüns 2 cm 10% $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$. Die Leistung beider Lampen wurde durch einen Spannungsgleichhalter konstant gehalten.

2. Gleichung zur Berechnung des Wirkungsspektrums

Die Manometriegefäße enthielten 7 bis 10 cmm Zellen in 7 ccm auf einer Fläche von 8,3 cm^2. Bei dieser Flächendichte wurden von dem eingestrahlten roten Licht etwa 30% und von dem eingestrahlten blaugrünen Licht etwa 50% von der Summe aller Chlorella-Pigmente absorbiert.

Für die Aufnahme des Wirkungsspektrums wäre es am einfachsten gewesen, die Zelldichten so niedrig zu wählen, daß die Intensität des katalysierenden Lichts beim Durchgang durch die Manometriegefäße sich nicht merklich änderte[2]. Da jedoch dann die manometrischen Ausschläge zu klein geworden wären, mußte mit erheblicher Absorption des katalysierenden Lichts gearbeitet werden, und es mußten aus den Intensitäten des ein- und austretenden Lichts die mittleren Intensitäten $\mathcal{J}$ des katalysierenden Lichts berechnet werden

$$\bar{\mathcal{J}} = \frac{\mathcal{J}_0 + \mathcal{J}}{2}.$$

Dann war in jeder Elementarschicht der Zellsuspensionen die von dem Photosynthese-Ferment absorbierte Quantenintensität des katalysierenden Lichts

$$-\Delta\mathcal{J} = \bar{\mathcal{J}} \cdot \beta \cdot c \cdot \mathrm{d}x, \qquad [1]$$

wo β der Absorptionskoeffizient des Ferments, c die Konzentration des Ferments und $\mathrm{d}x$ der Lichtweg ist.

Bestimmt man dann für verschiedene Wellenlängen 1 und 2 die $\mathcal{J}$-Werte, die gleiche katalytische Wirkungen erzeugen, für die also

$$-\Delta\mathcal{J}_1 = -\Delta\mathcal{J}_2,$$

so folgt aus [1]

$$\bar{\mathcal{J}}_1 \cdot \beta_1 \cdot c_1 \cdot \mathrm{d}x_1 = \bar{\mathcal{J}}_2 \cdot \beta_2 \cdot c_2 \cdot \mathrm{d}x_2, \qquad [2]$$

und wenn wir für ein und dieselbe Zellsuspension setzen

$$c_1 = c_2, \ \mathrm{d}x_1 = \mathrm{d}x_2,$$

so folgt aus [2]

$$\beta_1/\beta_2 = \frac{\bar{\mathcal{J}}_2}{\bar{\mathcal{J}}_1}. \qquad [3]$$

Dies ist unsere Gleichung zur Bestimmung des Absorptionsspektrums des Photosynthese-Ferments.

Man beachte, daß man es hier mit zwei verschiedenen Lichtabsorptionen zu tun hat: mit der Absorption durch die Summe der Chlorella-Pigmente, die man mit der Ulbrichtschen Kugel direkt mißt; und mit der Lichtabsorption durch das Photosynthese-Ferment, die man nicht direkt messen, sondern nur durch das Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts bestimmen kann.

Man beachte ferner, daß es bei Ableitung der Gl. [3] nicht korrekt war, die Licht-

wege dx bei der Variation der Wellenlängen gleichzusetzen, da wegen der Zerstreuung der Lichtweg zunimmt, wenn man zu kürzeren Wellenlängen übergeht. Dieser Fehler verzerrt das Wirkungsspektrum ein wenig in der Richtung, daß die kurzwelligeren Absorptionskoeffizienten höher erscheinen, als sie wirklich sind. Ein Weg, wie man diesen Fehler experimentell eliminieren könnte, ist in Protokoll II angedeutet.

3. Maß der Wirksamkeit des blaugrünen Lichts

Da das Luminoferment die Reduktion der Kohlensäure bewirkt, so ist das sachgemäße Maß der Blaugrün-Wirkung der Quotient $\gamma = \frac{-CO_2}{+O_2}$, der in reinem roten Licht 0 bis —0,5 war und bei Zustaz von blaugrünem Licht auf —1,15 bis —1,25 stieg.

Bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums wurden dann diejenigen Intensitäten verschiedener Wellenlängen bestimmt, die einen gleichen Anstieg von γ hervorbrachten. Dabei war es nicht notwendig, daß $\Delta\gamma$ das maximal durch Blaugrün Erreichbare war, wenn nur $\Delta\gamma$ für die verschiedenen Wellenlängen gleich war.

Als Bezugswellenlänge wählten wir willkürlich die Wellenlänge 470 mμ, deren Wirksamkeit bei Versuchen mit anderen Wellenlängen jedesmal mitbestimmt wurde.

Die Zeitintervalle, in denen das blaugrüne Licht hinzugefügt und wieder fortgenommen wurde, betrugen 30 Minuten. Bei dieser Zeiteinteilung wurden keine Induktionszeiten beobachtet, so daß also Anstieg und Abfall von γ in Zeiten vor sich gingen, die klein waren gegen 30 Minuten. Doch gilt dies nur für unsere heutigen Züchtungsbedingungen und hängt vielleicht mit dem Überschuß an 5wertigem Vanadium zusammen. Früher hatten wir Zellen in Händen, für die die positiven und negativen Induktionszeiten länger waren.

4. Vanadium

Seit wir im Jahre 1953 das Brunnenwasser bei der Kultur der Chlorella durch doppelt dest. Wasser ersetzt haben[3], war es notwendig, bei der Kultur nach den Vorschriften von Arnon[4] Mikroelemente zuzusetzen. Arnons Mikroelemente A enthalten Eisen, Borsäure, Mangan, Zink, Kupfer und Molybdän; seine Mikroelemente B enthalten Kobalt, Nickel, Chrom, Wolfram und Vanadium. Durch eine kürzliche Mitteilung von Arnon[5] ist es wahrscheinlich geworden, daß für die Kultur der Chlorella von der B-Gruppe nur das Vanadium notwendig ist; möglicherweise schaden sogar die anderen Elemente der B-Gruppe. Jedenfalls züchten wir zur Zeit mit den Mikroelementen A + Vanadium, doch muß die Möglichkeit offen gelassen werden, daß zeitweise auch Kobalt, Nickel oder Chrom notwendig sind.

Bei den Versuchen mit Vanadium machten wir die methodisch wichtige Feststellung[6], daß die Valenz des zugesetzten Vanadiums von Bedeutung ist. Das blaue Vanadylsulfat $VOSO_4 \cdot 2H_2O$, in dem das Vanadium 4wertig ist, wirkt *nicht*,

während das gelbe Metavanadat $NaVO_3 \cdot 4H_2O$, in dem das Vanadium 5wertig ist, stark und schnell wirkt. Da an der Luft in neutralen verdünnten Lösungen von Vanadylsulfat langsam 5wertiges Vanadium entsteht, ist der Unterschied zwischen den beiden Valenzstufen des Vanadiums nur deutlich, wenn die Lösungen frisch bereitet und die Versuche kurz sind.

Bei der Feststellung dieser Unterschiede war es ein wesentlicher methodischer Vorteil, daß vanadiumarme Chlorella in manometrischen Versuchen sofort mit einer Zunahme der photochemischen Ausbeute reagiert, wobei wie bei Zusatz blaugrünen Lichts die CO_2-Aufnahme schneller zunimmt als die O_2-Entwicklung, so daß bei Zusatz von 5wertigem Vanadium der numerische Wert von γ sehr erheblich ansteigt.

Z. B. wurden die folgenden γ und $\frac{1}{q}$-Werte erhalten, wenn die Zellen ohne Vanadiumzusatz gezüchtet worden waren und wenn dann kurz vor der Messung des Quantenbedarfs — der 30 bis 60 Min. dauerte — das Vanadium in einer Menge von 100 γ pro l zugesetzt wurde. Das Meßlicht war dabei 546 mμ, $\mathcal{J} = 54{,}3$, das katalysierende Licht die blauen Cadmiumlinien der Jupiterlampe, $\mathcal{J} = 0{,}6$.

		γ	$\frac{1}{q}$
Versuch 1	Ohne V-Zusatz	—0,17	14
	+ 5wertiges V	—1,16	3,2
Versuch 2	+ 4wertiges V	0	15
	+ 5wertiges V	—1,0	4,0

Wir züchten zur Zeit mit 100 γ 5wertigem Vanadium pro l Kulturlösung und geben zu den Zellsuspensionen vor dem Einfüllen in die Manometriegefäße noch 100 γ 5wertiges Vanadium pro l Zellsuspension hinzu, beide Zusätze in Form von $NaVO_3 \cdot 4H_2O$. Um sicher zu gehen, daß die Vanadium-Zusätze optimal sind, mag man sie bei Bestimmungen des Quantenbedarfs variieren.

Die andern Salze unserer Kulturlösung sind: 5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 2 g NaCl + 2 g KNO_3 + 0,5 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$, zu 1 l aus Quarz dest. Wasser. pH ist etwa 4,2 und steigt im Lauf der Kultur an.

Die Stammlösung der Arnonschen Mikroelemente A hat die Zusammensetzung: 500 mg $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 1000 mg $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\,H_2O$ + 300 mg HBO_3 + 200 mg $MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$ + 22 mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 8 mg $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mg $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4\,H_2O$, zu 1000 ccm $n/200$ —H_2SO_4.

Vor der Beimpfung der Zuchtkolben werden 2 ccm der Stammlösung zu 250 ccm Kultursalz-Lösung gegeben.

Wir züchteten an einem Südfenster unter Zusatz einer 200-Watt-Metallfadenlampe, die in 20 cm Entfernung von den Kulturflaschen aufgestellt war. Zeitweise, in der dunklen Jahreszeit, züchteten wir unter Zusatz einer 100-Watt-Metallfadenlampe, die in 24 Stunden 8 Stunden nicht brannte.

Noch immer gibt es wichtige Kultureinflüsse, die wir nicht kennen und die herauszufinden zur Zeit zu den Hauptaufgaben der Photosynthese-Forschung gehört. Z. B. können wir die guten Ausbeuten, die wir in den Jahren 1951 und 1952

regelmäßig in Bicarbonat-Carbonat bei pH 8,8 erhalten haben, heute nicht mehr erhalten. Wahrscheinlich enthielt das Brunnenwasser, das damals zur Kultur verwendet wurde, außer unsern heute verwendeten Mikroelementen noch ein anderes Mikroelement.

5. Wachstum

Dean Burk[7] hat darauf aufmerksam gemacht, daß bei unseren Versuchen von 1950 die Energieausbeute bei der Photosynthese um so größer war, je größer der numerische Wert des Quotienten $\gamma = \frac{CO_2}{O_2}$ war; daß man die besten Ausbeuten bei γ —1,3 findet und daß die Ausbeuten bei γ —0,82 wesentlich schlechter sind. Diese Erfahrung ist in den letzten Jahren durchweg bestätigt worden. Zur Erklärung führt Burk an, daß die Umwandlung von Kohlenhydrat in Protein oder Fett mit großen Energieverlusten verbunden ist, wie man aus den Arbeiten von Pasteur über Hefe und aus der Tierphysiologie weiß. Folgendes läßt sich über diese Zusammenhänge sagen:

Wenn die Kohlensäure in zwei Stufen reduziert wird, zuerst in der reduktiven Carboxylierung zur Stufe der Ameisensäure

$$CO_2 + 2\,H + R\,CHO = R\,CHOH\,COOH$$

und dann in der Reduktion der Carboxylgruppe zur Stufe des Zuckers

$$R\,CHOH\,COOH + 2\,H = R\,CHOH\,CHO + H_2O,$$

so ist

für die erste Reduktionsstufe	$\gamma = -2{,}0$,
für die zweite Reduktionsstufe	$\gamma = 0$,
für beide Reduktionsstufen zusammen	$\gamma = -1{,}0$.

Für alle weiteren Reduktionen, z. B. von Zucker zu Protein, ist $\gamma = 0$, so daß also γ sinkt, wenn zur Photosynthese Proteinbildung hinzukommt.

Aus diesen Überlegungen folgt jedoch *nicht*, daß der Quantenbedarf der Sauerstoffentwicklung in der Bilanz steigen muß, wenn wie bei der Proteinbildung die Kohlensäure durch einen anderen Wasserstoffacceptor ersetzt wird. Das Steigen des Quantenbedarfs mit sinkendem γ ist also lediglich eine Erfahrungstatsache. Sucht man nach einer Erklärung, so ist daran zu denken, daß ein Teil der Energie der induzierten Atmung für die sekundären Stoffwechselvorgänge abgezweigt wird, so daß zur Wiederherstellung der Sauerstoffkapazität *mehr* Sauerstoff zurückreagieren muß, wenn Zucker der Wasserstoffacceptor ist, als wenn CO_2 der Wasserstoffacceptor ist.

Wie dies nun auch sein mag, jedenfalls ist ein Quantenbedarf, den man findet, nur dann der Quantenbedarf der Photosynthese, wenn $\gamma = -2{,}0$ bis $-1{,}0$ ist; wenn also das Wachstum gegen die Photosynthese zu vernachlässigen ist. Die praktische Konsequenz dieser Überlegungen ist, daß man darauf bedacht sein wird, zur Messung der Photosynthese Zellen zu benutzen, die unter den Bedingungen der Messungen möglichst wenig Protein bilden, d. h. möglichst wenig wach-

sen. Man könnte sich denken, daß dies mit einer geeigneten Auswahl von Mikroelementen erreicht werden kann, indem man zum Beispiel vor der Messung alle Mikroelemente fortwäscht und dann nur solche Mikroelemente, die mit der CO_2-Reduktion zu tun haben, zusetzt.

Anmerkung bei der Korrektur: Nach einer kürzlich erschienenen Arbeit von *Tolbert*[9] bildet Chlorella bei der Photosynthese Glykolsäure, für deren Entstehung aus CO_2 und H_2O $\gamma = \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}33$ ist. Man könnte also unsere Erfahrungen dahin zusammenfassen, daß die Ausbeuten am besten bei der Glykolsäurebildung sind, d. h. bei dem Vorgang, bei dem die Kohlensäure der alleinige H-Acceptor ist.

6. Quantenbedarf bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums

Da eine gute Energieausbeute eine Gewähr dafür ist, daß die Chlorella richtig gezüchtet worden ist; daß die Lichtwirkung linear zur Licht-Intensität ist; und daß Wachstum und andere sekundäre Stoffwechselvorgänge gegen die Photosynthese zu vernachlässigen sind, so sollte bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums aus methodischen Gründen der Quantenbedarf gemessen werden, obwohl der Quantenbedarf in der Gleichung zur Berechnung des Wirkungsspektrums nicht vorkommt. Der Quantenbedarf pro Mol. Sauerstoff war bei unsern Versuchen *ohne* Berücksichtigung der Atmung 4,5 bis 5,5 und *mit* Berücksichtigung der Atmung 3,8 bis 4,7, falls genügend Blaugrün zugesetzt wurde. Ohne Blaugrün war der Quantenbedarf ein Mehrfaches davon.

Würde man mit dünneren Zellsuspensionen arbeiten, so würde die Atmung weniger ausmachen, doch würden dann die manometrischen Ausschläge für die Aufnahme des Wirkungsspektrums zu klein werden. Die Atmung würde ferner weniger ausmachen, wenn man Grün anstatt Rot als Meßlicht benutzen würde, da die Wirkung des Grün bis zu höheren Intensitäten linear bleibt (Protokoll III). Doch ist bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums aus optischen Gründen rotes Meßlicht vorzuziehen, wie in Abschnitt 8 näher begründet wird.

Wellenlängen λ [mμ]	Quantenintensitäten gleicher Wirkung $\bar{J}$ [cmm Quanten pro Minute]	Auf 470 mm bezogenen Wirkungsstärken $\frac{W\lambda}{W_{470}}$
401	20	0,05
418	3,2	0,33
440	1,7	0,62
457	0,57	1,85
470	1,05	1,00
490	2,70	0,39
501	15,0	0,072
520	30,0	0,035

Tabelle 1. Meßlicht 645 mμ, J = 17 cmm Quanten pro Minute

7. Wirkungsspektrum

In Protokoll I ist die Bestimmung der katalytischen Wirkungsstärken für die Wellenlängen 440 mμ, 457 mμ und 470 mμ mit allen experimentellen Einzelheiten beschrieben. Im ganzen haben wir die katalytischen Wirkungsstärken von 8 blaugrünen Wellenlängen bestimmt, wobei immer 645 mμ das Meßlicht war. Das Ergebnis findet man in Tab. 1 und graphisch in Abb. 1.

Wie man aus der Abb. 1 sieht, hat das Wirkungsspektrum ein scharfes Maximum um 460 mμ und fällt ziemlich gleichmäßig nach beiden Seiten ab.

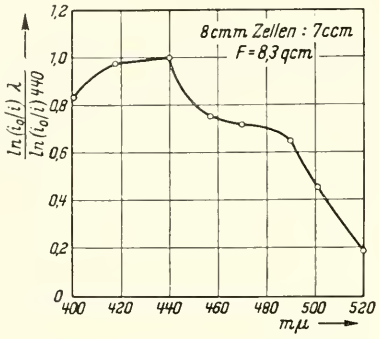


Abb. 3. Absorptionsspektrum lebender Chlorella, aufgenommen mit der Ulbrichtschen Kugel

Zum Vergleich wurde unter gleichen Bedingungen der Zelldichte mit gleichen Volumina Zellsuspension in den gleichen Manometriegefäßen das Absorptionsspektrum einer Chlorella-Suspension mit Hilfe der Ulbrichtschen Kugel aufgenommen und so das Absorptionsspektrum der Summe aller Chlorella-Pigmente für lebende Chlorella erhalten (Abb. 3).

Wie man aus Abb. 3 sieht, hat das Absorptionsspektrum der Chlorella eine andere Form als das Wirkungsspektrum des Photosynthese-Ferments. In Protokoll II findet man experimentelle Einzelheiten über die Aufnahme dieses Spektrums sowie eine Bemerkung über den Einfluß der Zerstreuung auf die Form des Spektrums.

8. Grün als Meßlicht

Läßt man bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums die Wellenlängen von 501 auf 520 mμ zunehmen, so sinkt nach Abb. 1 die Wirkungsstärke auf etwa die Hälfte. Nimmt man an, daß bei einer weiteren gleichen Zunahme der Wellenlänge die katalytische Wirkungsstärke wiederum auf die Hälfte sinkt, so wäre die Wirkungsstärke der grünen Quecksilberlinie 546 mμ etwa 0,01, d. h. eine Quantenintensität $\mathcal{J} = 100$ der Wellenlänge 546 mμ müßte merklich katalytisch wirken. Da nun Grün von Chlorophyll nur schwach absorbiert wird und man deshalb, wenn Grün das Meßlicht sein soll, große Intensitäten einstrahlen muß, so ist mit grünem Meßlicht die katalytische Wirkung des blaugrünen Lichtes nicht so deutlich zu demonstrieren wie mit rotem Meßlicht.

Im Protokoll III ist ein Versuch mit Grün als Meßlicht beschrieben, bei dem 100 mm³ Quanten der Wellenlänge 546 mμ pro Minute eingestrahlt wurden. γ sank

dann in dem reinen grünen Licht nicht auf 0, sondern nur auf —0,8 und stieg bei Zusatz von Blaugrün (J = 0,6) auf —1,17 an. $\Delta\gamma$ war also nur 0,37, während es mit Rot als Meßlicht etwa 1,0 gewesen wäre. Der Quantenbedarf mit Grün + Blaugrün war 4,4 und stieg bei Fortnahme des Blaugrüns auf 7, während, wenn Rot das Meßlicht gewesen wäre, der Quantenbedarf bei Fortnahme des Blaugrüns auf etwa 14 gestiegen wäre.

9. Modelle

Vergleichen wir das Wirkungsspektrum des Photosynthese-Ferments mit dem Spektrum der Chlorella-Pigmente, so scheidet das Chlorophyll wegen seiner Bande im Rot aus. Die Carotinoide und Flavine der Chlorella absorbieren zwar wie das Ferment im wesentlichen im Blaugrün, aber die Spektren der aus Chlorella extrahierten Carotene, Xanthophylle und Flavine weichen nach der blauen Seite wesentlich von dem Wirkungsspektrum des Photosynthese-Ferments ab.

Im übrigen würde uns bei der Suche nach einem Modell des Ferments die Übereinstimmung der Absorptionsspektren nicht genügen. Das Pigment, das wir suchen, muß außerdem eine Proteinverbindung sein, da es ein Ferment ist; es muß ferner im Licht schnell chemisch verändert werden und muß im Dunkeln schnell zu seiner Vorstufe zurückreagieren, da die Blaugrün-Wirkung schnell auftritt und bei Fortnahme des Blaugrüns schnell wieder verschwindet. Bestehen wir auf diesen 4 Forderungen, von denen die beiden letzten sehr speziell sind, so bleibt von allen bekannten Pigmenten nur der Sehpurpur übrig, der nach MORTON[10] eine Verbindung von Vitamin A-Aldehyd mit einem Protein, also ein Carotinoido-Proteid, ist und der die Forderung der schnellen reversiblen Lichtreaktion erfüllt, die seine physiologische Funktion ist, und der durch den Wechsel Alkohol $\rightleftarrows$ Aldehyd Wasserstoff übertragen kann.

Von andern möglichen Modellen möchten wir die von RICHARD KUHN[11] untersuchten Carotinoid-Proteide erwähnen, als deren prosthetische Gruppe KUHN das Astaxanthin erkannte, ein doppeltes α-Ketol, das Wasserstoff durch den Übergang Ketol $\rightleftarrows$ Diketon übertragen kann und das in den Hummereiern (Maximum 470 mμ), aber auch — hier besonders wichtig — in der Grünalge *Hämatococcus pluvialis* gefunden worden ist. Allerdings ist von diesen Proteiden noch nicht gezeigt worden, daß sie wie der Sehpurpur schnell und reversibel auf Licht reagieren.

Protokoll I (26. 7. 1955). *Meßlicht* 645 *mμ*

Die Punkte 440, 457 *und* 470 *mμ des Wirkungsspektrums*

Zellen: 1tägige Kultur, Südfenster + 200 Watt-Metallfadenlampe. In Kultursalzlösung + Mikroelemente A + wenig 5wertiges Vanadium. In 5 CO_2, 10 O_2, 85 Argon. Saat 60 cmm pro 250 ccm, Ernte 304 cmm. pH 5,2. Vor der Messung 100 γ 5wertiges Vanadium als $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$ zugegeben.

Manometrie: Gefäßpaar, Kästchen. Eingefüllt 7 ccm Zellsuspension, die je 8,5 cmm Zellen enthielten. Temperatur 20°. Gasraum 5 CO_2, 10 O_2, 85 Argon. 90 Min. vorbelichtet, wo J die pro Minute eingestrahlten Quanten bedeuten.

Kleines Gefäß: $v' = 16{,}759$, $v'_F = 7{,}00$, $k'_{O_2} = 0{,}931$, $k'_{CO_2} = 1{,}519$.

Großes Gefäß: $v = 21{,}547$, $v_F = 7{,}00$, $k_{O_2} = 1{,}377$, $k_{CO_2} = 1{,}965$.
$x_{O_2} = H' \cdot 7{,}43 - H \cdot 9{,}61$,
$x_{CO_2} = -H' \cdot 10{,}6 + H \cdot 15{,}67$.

Lichtabsorption, gemessen mit der Ulbrichtschen Kugel, in den Manometriegefäßen. a_λ ist der absorbierte Bruchteil des eingestrahlten Lichts, der Wellenlänge λ.

λ mμ	a_λ anfangs	a_λ Ende
440	0,605	
457	0,51	
470	0,50	
645	0,28	0,34

Mittlere Intensität des katalysierenden Lichts $\mathcal{J}$

$$\bar{\mathcal{J}} = \frac{\mathcal{J} + \mathcal{J}(1 - a)}{2},$$

wo $\mathcal{J}$ die eingestrahlte und $\mathcal{J} \cdot (1 - a)$ die austretende Quantenintensität bedeutet.

Quantenbedarf: Bei der Berechnung wurde nur der aus der Zelle austretende Sauerstoff berücksichtigt, also die Atmung vernachlässigt. Von dem katalysierenden Licht wurde nur der vom Chlorophyll absorbierte Bruchteil eingesetzt, also zum Beispiel, wenn in t Min. x_{O_2} cmm Sauerstoff aus der Zelle entwickelt waren:

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{\left[\mathcal{J}_{645} \cdot a_{645} + \frac{1}{2}(\mathcal{J}_{457} \cdot a_{457})\right] \cdot t}{x_{O_2}},$$

wo für das Meßlicht die Zunahme von a_{645} im Laufe des Versuchs durch geradlinige Interpolation berücksichtigt wurde, während für das katalysierende Licht die Zunahme der Lichtabsorption zu vernachlässigen war.

Nach 90′ Vorbelichtung

Großes Gefäß mm Brodie				Kleines Gefäß mm Brodie	
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{440} = 2{,}17$ $\mathcal{J}_{440} = 1{,}4$	30′	+ 4,5	+ 9,5	x_{O_2} + 27,4 x_{CO_2} − 30 γ − *1,09*	$\frac{1}{\varphi} = 6{,}2$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{440} = 1{,}08$ $\mathcal{J}_{440} = 0{,}75$	60′	+ 10,0	+ 18,0	x_{O_2} + 38 x_{CO_2} − 34 γ − *0,87*	$\frac{1}{\varphi} = 8{,}8$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ ohne Blaugrün	30′	+ 4,5	+ 7,0	x_{O_2} + 8,8 x_{CO_2} − 4 γ − *0,44*	$\frac{1}{\varphi} = 20$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{440} = 0{,}74$ $\mathcal{J}_{440} = 0{,}502$	30′	+ 5,0	+ 9,0	x_{O_2} + 19 x_{CO_2} − 17 γ − *0,89*	$\frac{1}{\varphi} = 9{,}0$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{470} = 1{,}47$ $\mathcal{J}_{470} = 1{,}1$	30′	+ 4,5	+ 11,0	x_{O_2} + 38,3 x_{CO_2} − 42,9 γ − *1,17*	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}5$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{457} = 0{,}58$ $\mathcal{J}_{457} = 0{,}43$	30′	+ 4,0	+ 9,0	x_{O_2} + 28,6 x_{CO_2} − 32,5 γ − *1,14*	$\frac{1}{\varphi} = 6{,}0$

Großes Gefäß mm Brodie				Kleines Gefäß mm Brodie	
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{457} = 1{,}03$ $\mathcal{J}_{457} = 0{,}73$	30′	+ 4,0	+ 10,0	x_{O_2} + 35,9 x_{CO_2} — 43 γ — *1,20*	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}9$
$\mathcal{J}_{645} = 16{,}9$ $\mathcal{J}_{470} = 1{,}28$ $\mathcal{J}_{470} = 1{,}1$	30′	+ 4,0	+ 10,0	x_{O_2} + 35,9 x_{CO_2} — 43 γ — *1,20*	$\frac{1}{\varphi} = 5{,}1$

woraus folgt, daß etwa gleich wirken: $\overline{\mathcal{J}}_{470} = 1{,}1$; $\overline{\mathcal{J}}_{440} = 1{,}70$; $\overline{\mathcal{J}}_{457} = 0{,}57$.

Protokoll II (30. 7. 1955). *Absorptionsspektrum lebender Chlorella*

Ist bei der Messung mit der Ulbrichtschen Kugel $\mathcal{J}_0$ die in die Zellsuspension eingestrahlte und $\mathcal{J}$ die austretende Licht-Intensität, so setzen wir

$$\mathcal{J} = \mathcal{J}_0\, e^{-b \cdot d},$$

wo b der Absorptionskoeffizient und d der Lichtweg ist.

Variiert man die Wellenlänge und läßt das Volumen der Zellsuspension und die Dichte der Zellen konstant, so ist

$$\frac{\ln (\mathcal{J}_0/\mathcal{J})_1}{\ln (\mathcal{J}_0/\mathcal{J})_2} = \frac{b_1 \cdot d_1}{b_2 \cdot d_2}.$$

Anders als im Fall von Lösungen ist hier wegen der Änderung der Zerstreuung mit der Wellenlänge

$$d_1 \text{ nicht} = d_2,$$

sondern d nimmt zu, wenn man zu kürzeren Wellenlängen übergeht. $\ln \mathcal{J}_0/\mathcal{J}$ als Funktion der Wellenlänge aufgetragen, ergibt also eine Kurve, die wegen der Zerstreuung über der wahren Absorptionskurve der Pigmente liegt, um so mehr, je kürzer die Wellenlängen sind. In derselben Weise ist das Wirkungsspektrum des Ferments — das ja gleichfalls mit lebender Chlorella aufgenommen ist — in Richtung Blau verzerrt.

Um zu ermitteln, wieviel diese Verzerrung ausmacht, bestimmten wir mit der Ulbrichtschen Kugel $\ln \mathcal{J}_0/\mathcal{J}$ einmal für lebende Zellen und dann für einen Methanolextrakt der gleichen Zellen bei gleicher Pigmentkonzentration in den gleichen Gefäßen. Für 7 ccm auf einer Fläche von 8,3 cm² bei einer Zelldichte von 2,5 cmm Zellen pro cm³ fanden wir:

$$\left.\begin{array}{ll} 645\ \mathrm{m}\mu.\ \text{Lebende Zellen.} & \mathcal{J}'_0/\mathcal{J}' = 6{,}23,\ \ln \frac{\mathcal{J}'_0}{\mathcal{J}'} = 1{,}829 \\ 645\ \mathrm{m}\mu.\ \text{Methanol-Extrakt.} & \mathcal{J}_0/\mathcal{J}' = 5{,}38,\ \ln \frac{\mathcal{J}'_0}{\mathcal{J}'} = 1{,}77 \end{array}\right\} \frac{\text{Zellen}}{\text{Extrakt}} = 1{,}03$$

$$\left.\begin{array}{ll} 546\ \mathrm{m}\mu.\ \text{Lebende Zellen.} & \mathcal{J}'_0/\mathcal{J}' = 1{,}73,\ \ln \frac{\mathcal{J}_0}{\mathcal{J}} = 0{,}548 \\ 546\ \mathrm{m}\mu.\ \text{Methanol-Extrakt} & \mathcal{J}'_0/\mathcal{J}' = 1{,}417,\ \ln \frac{\mathcal{J}_0}{\mathcal{J}} = 0{,}349 \end{array}\right\} \frac{\text{Zellen}}{\text{Extrakt}} = 1{,}57,$$

d. h. die Zerstreuung machte bei 645 mμ wenig aus, bei 546 mμ jedoch so viel, daß der Lichtweg in der Zellsuspension 1,57mal so groß war wie in der Lösung. Dabei machen wir die wahrscheinliche Annahme, daß die Absorption der Pigmente durch ihre Bindung in der Zelle nur wenig geändert wird, zumal die Differenzen bei den kürzeren Wellenlängen auftreten.

Aus diesen Überlegungen folgt, daß das Absorptionsspektrum der lebenden Chlorella durch zwei Einflüsse zustande kommt, durch die Änderung der Pigmentabsorption mit der Wellenlänge und durch die Änderung der Zerstreuung mit der Wellenlänge.

Die Zellen stammten aus einer 1tägigen Südfenster-Kultur + 200-Watt-Metallfadenlampe. 8 mm³ Zellen, suspendiert in 7 ccm Kulturlösung, wurden in ein Manometriekästchen eingefüllt, dessen Grundfläche 8,3 cm² betrug. Wir fanden:

λ mμ	$\mathcal{J}_0/\mathcal{J}$	$\ln \mathcal{J}_0/\mathcal{J}$	$\ln (\mathcal{J}_0/\mathcal{J})_\lambda : \ln (\mathcal{J}_0/\mathcal{J})_{440}$
401	2,11	0,747	0,842
405	2,08	0,732	0,825
418	2,34	0,875	0,983
440	2,43	0,888	1,000
457	1,95	0,670	0,762
470	1,91	0,647	0,728
490	1,79	0,582	0,655
501	1,505	0,409	0,460
520	1,19	0,174	0,196
548	1,085	0,082	0,092
578	1,18	0,165	0,186
605	1,24	0,215	0,242
632	1,31	0,270	0,304
645	1,38	0,322	0,362
654	1,46	0,378	0,438
668	1,70	0,531	0,597

Protokoll III (1. 6. 1955). *Grün als Meßlicht*

Zellen: 2tägige Kultur, Südfenster + 200-Watt-Metallfadenlampe. In Kultursalzlösung + Mikroelemente A. In 5 CO_2, 10 O_2, 85 Argon. Saat 30 cmm Zellen in 250 ccm. Ernte 610 cmm. pH 5,6. Mit Kulturlösung auf 7 cmm : 7 ccm verdünnt. Vor der Messung 100 γ 5wertiges Vanadium als $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$ zugegeben.

Manometrie: Wie Protokoll I.

Meßlicht: Hg-Linie 546 mμ, aus 500-Watt-Hg-Hochdrucklampe, 2 cm 10% $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mm Orangeglas I von Schott + 10 mm Didymscheibe. Die Filterscheiben befanden sich in fließendem Wasser, da sie ihre Durchlässigkeit bei Erwärmung erheblich ändern!

Blaugrün: 60-Watt-Cadmiumrohr von Heraeus Hanau („Jupiterlampe"), in 100 cm Entfernung von den Manometriegefäßen, + 2 mm Blauglas 23 von Schott. Eingestrahlte Intensität $\mathcal{J}$ aktinometrisch gemessen, indem das Versuchsgefäß im Thermostaten durch ein Aktinometergefäß gleicher Dimension ersetzt wurde. $\mathcal{J} = 0{,}6$ cmm Quanten pro Minute (ist 468 + 480 + 509 mμ).

Lichtabsorption: Der absorbierte Bruchteil a des grünen Lichts wurde mit der Ulbrichtschen Kugel am Anfang und am Ende des Versuchs gemessen. Anfang $a = 0{,}132$, Ende $a = 0{,}148$. Die Absorption für die dazwischenliegenden Zeiten wurde durch geradlinige Interpolation berechnet.

Berechnung des Quantenbedarfs: Die absorbierte Intensität des blaugrünen Lichts konnte vernachlässigt werden. Wurden von dem Meßlicht $\mathcal{J}$ cmm Quanten pro Minute eingestrahlt und wurden in t Min. x_{O_2} cmm Sauerstoff aus der Zelle entwickelt, so war der Quantenbedarf

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{(\mathcal{J}_{546} \cdot a_{546}) \cdot t}{x_{O_2}}$$

Die Atmung wurde also vernachlässigt.

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
$\mathcal{J}_{546} = 101$, $\mathcal{J}_{\text{blaugrün}} = 0{,}6$	40′ + 20,5; + 43,5	x_{O_2} + 123, x_{CO_2} — 138, γ — *1,12*	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}37$
$\mathcal{J}_{546} = 101$, $\mathcal{J}_{\text{blaugrün}} = 0$	30′ + 17; + 29,5	x_{O_2} + 55, x_{CO_2} — 45, γ — *0,82*	$\frac{1}{\varphi} = 7{,}4$
$\mathcal{J}_{546} = 101$, $\mathcal{J}_{\text{blaugrün}} = 0{,}6$	30′ + 14,5; + 32,0	x_{O_2} + 97, x_{CO_2} — 109, γ — *1,12*	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}3$

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
$J_{546} = 101$, $J_{\text{blaugrün}} = 0$	30′ + 16,5; + 29,0	x_{O_2} + 56, x_{CO_2} — 46, γ — 0,82	$\frac{1}{\varphi} = 7{,}6$
$J_{546} = 101$, $J_{\text{blaugrün}} = 0{,}6$	30′ + 15,5; + 34	x_{O_2} + 101, x_{CO_2} — 114, γ — 1,13	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}26$
$J_{546} = 101$, $J_{\text{blaugrün}} = 0$	30′ + 17; + 30,5	x_{O_2} + 61, x_{CO_2} — 56, γ — 0,92	$\frac{1}{\varphi} = 7{,}2$
$J_{546} = 101$, $J_{\text{blaugrün}} = 0{,}6$	30′ + 15; + 33	x_{O_2} + 100, x_{CO_2} — 113, γ — 1,13	$\frac{1}{\varphi} = 4{,}4$

Der pro Stunde aus den Zellen entwickelte Sauerstoff betrug hierbei das 26fache Zellvolumen, wenn das Blaugrün zugegeben wurde, und das 16fache Zellvolumen, wenn das Blaugrün fortgenommen wurde.

Literatur

1 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 667.
2 Wie es z. B. der Fall war bei Aufnahme des Wirkungsspektrums der Eisenoxygenase der Zellatmung. Vgl. Biochem. Z. 193 (1928), 339; 214 (1929), 26, 64.
3 Warburg, O., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 12 (1953), 356.
4 Arnon, D., Amer. J. Bot. 25 (1938), 322.
5 Arnon, D., Nature (London) 172 (1953), 1039.
6 Warburg, O., Krippahl, G., und Buchholz, W., Z. Naturforschg. 10b (1955), 422.
7 Burk, Dean, Fed. Proc. 12 (1953), 611.
8 Warburg, O., und Burk, Dean, Arch. Biochemistry 25 (1950), 410.
9 Tolbert, N. E., Fed. Proc. 14 (1955), 292.
10 Ball, S., Goodwin, T. W., und Morton, R. A., Nature (London) 153 (1944), 405; Bioch. J. 42 (1948), 516.
11 Kuhn, R., Stene, J., und Sörensen, N. A., Ber. dtsch. chem. Ges. 72 (1939), 1688.

30 Sauerstoff-Kapazität der Chlorella*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl, Walter Schröder und Wolfgang Buchholz

Die Sauerstoffmenge, die aus einer gegebenen Menge Chlorella (durch kurze starke Belichtung) entwickelt werden kann, wird als die Sauerstoffkapazität der Chlorella bezeichnet. Sie beträgt im Mittel 200 mm^3 Sauerstoff pro cm^3 Chlorella und ist etwa so groß wie die Sauerstoff-Kapazität des Blutes.

Wenn bei der Photosynthese der Chlorella 3 Lichtquanten 1 Mol. O_2 entwickeln, so ist dies das Ergebnis von 4 Reaktionen[1]:**

$$1\ N_0\ h\nu + RH_4O_2 = RH_4 + 1\ O_2 \qquad [1]$$

$$RH_4 + 1\ CO_2 = R + 2\ H_2O + 1\ C \qquad [2]$$

$$^2/_3\ C + {}^2/_3\ O_2 = {}^2/_3\ CO_2 + 70\,000\ \text{cal.} \qquad [3]$$

$$70\,000\ \text{cal.} + R + 2\ H_2O = RH_4O_2 \qquad [4]$$

$$\text{Bilanz: } 1\ N_0\ h\nu + {}^1/_3\ CO_2 = {}^1/_3\ C + {}^1/_3\ O_2 \qquad [5]$$

Reaktion [1] ist die Photodissoziation einer Sauerstoff-Verbindung. Die Dissoziationsenergie ist durch die molare Quantenenergie der längsten wirksamen Wellenlänge — etwa 700 mμ — gegeben und beträgt rund 40000 Kalorien.

Statt [1] und [2] kann man auch schreiben:

$$1\ N_0\ h\nu + RH_4O_2 + 1\ CO_2 = (RH_4CO_2) + 1\ O_2, \qquad [1a]$$

$$(RH_4CO_2) = R + 2\ H_2O + 1\ C, \qquad [2b]$$

d. h., man kann die Reaktion [1] als eine photochemische Verdrängung auffassen.

Reaktion [3] ist die „induzierte Atmung". Durch die induzierte Atmung erhält die Zelle die 70000 Kalorien zurück, die sie zur Photosynthese beigetragen hat und die sie in Reaktion [4] der Photosynthese wieder zur Verfügung stellt.

Während Reaktion [1] nur im Licht verläuft, können die übrigen Reaktionen auch im Dunkeln verlaufen. Trotzdem sind sie abhängig vom Licht, da ihre Fermente, zum mindesten ein Teil ihrer Fermente, Luminofermente sind, die sich im Licht aus Profermenten bilden und sich im Dunkeln wieder zu Profermenten zurückbilden. Durch die katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts[2] ist bereits *eines* dieser Luminofermente entdeckt worden. Ein anderes Luminoferment muß an der induzierten Atmung beteiligt sein, da die induzierte Atmung um so schneller verläuft, je stärker man belichtet. Erst wenn die Sauerstoffentwicklung pro Stunde das 50fache des Zellvolumens beträgt, hat die induzierte Atmung unserer Chlorella — mit einem Stundenwert des 100fachen Zellvolumens — ihren Grenzwert erreicht.

Im allgemeinen laufen die Reaktionen [1] bis [4] gleichzeitig ab, und was in Erscheinung tritt, ist nur die Bilanz der 4 Reaktionen, die Reaktion [5]. Gelingt es aber, die Reaktionen [3] oder [4] wesentlich zu verlangsamen, so kann man die

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 9b (1954): 769.

** *Zusatz 1961.* Hier ist die Photosynthese entsprechend der damals herrschenden Meinung, noch als Photolyse des Wassers geschrieben.

Photosynthese in ihre Teilreaktionen spalten. Wir beschreiben im Folgenden die experimentellen Bedingungen — den Salzgehalt, pH, die Gasdrucke und die Lichtintensität —, durch deren Zusammenwirken es gelingt, diese Spaltung fast vollständig und immer reproduzierbar hervorzurufen.

Wir haben von der Kenntnis dieser Bedingungen zunächst Gebrauch gemacht, um die O_2-Menge zu bestimmen, die man aus einer gegebenen Menge Chlorella in maximo mit Licht austreiben kann, mit andern Worten, um die Menge der Substanz RH_4O_2 unsrer Gleichungen zu bestimmen. Wir nennen diese Sauerstoffmenge die „O_2-Kapazität" der Chlorella und finden, daß aus 1 cm^3 Chlorella, je nach dem Chlorophyllgehalt, 150—250 mm^3 O_2 ausgetrieben werden können*.

Was diese Zahl bedeutet, macht man sich am besten klar durch einen Vergleich mit der O_2-Kapazität der roten Blutzellen, die etwa 300 mm^3 O_2 pro cm^3 Zellen beträgt. *Die O_2-Kapazität der Chlorella ist von der gleichen Größenordnung wie die O_2-Kapazität der roten Blutzellen* und kann also mit der gleichen Genauigkeit wie die O_2-Kapazität des Blutes bestimmt werden. Beide Kapazitäten aber unterscheiden sich wesentlich durch die Festigkeit, mit der der O_2 in den Zellen gebunden ist. In Chlorella ist der O_2 mit 40000 Kalorien sehr fest gebunden, während er aus roten Blutzellen bereits bei Erniedrigung des O_2-Drucks abdissoziiert.

Treibt man die O_2-Kapazität aus Chlorella aus, so ist zunächst die Quantenausbeute $\varphi = 1$. Sie wird 0,5, wenn die Hälfte der Kapazität ausgetrieben ist, und sie wird sehr klein, wenn fast die gesamte Kapazität ausgetrieben ist. Die einfachste Erklärung dieses Parallelismus zwischen Quantenausbeute und Rest-Kapazität ist, daß der Träger des Sauerstoffs stöchiometrisch mit dem Chlorophyll verbunden ist und daß nur solches Licht O_2 austreibt, das von dem verbundenen Chlorophyll absorbiert wird. Tatsächlich findet man, wenn man mit dieser Annahme rechnet, für den ganzen zeitlichen Verlauf der O_2-Austreibung die Quantenausbeute $\varphi = 1$.

Hierzu stimmt, daß die O_2-Kapazität der Chlorella mit ihrem Chlorophyllgehalt wächst. Die O_2-Kapazität ist *gleich* dem Chlorophyllgehalt, wenn der Chlorophyllgehalt, wie bei den Zellen junger Kulturen, 3,5% nicht übersteigt. Bei höheren Chlorophyllgehalten bleibt die Kapazität hinter dem Chlorophyllgehalt zurück, was zu unsern Erfahrungen stimmt, daß bei höheren Chlorophyllgehalten ein Teil des Chlorophylls sich nicht an der Photosynthese beteiligt.

Auf die Austreibung des O_2 folgt gemäß unsern Gleichungen die Wiederherstellung der O_2-Kapazität durch die Energie der induzierten Atmung. Induzierte Atmung und Wiederherstellung der O_2-Kapazität müssen also zeitlich zusammengehen und insbesondere muß die O_2-Kapazität wiederhergestellt sein, wenn die induzierte Atmung abgeklungen ist. Unter unsern Versuchsbedingungen betrug diese Abklingungszeit 25—30 Dunkelminuten, wie aus den Abb. 1 und 2 zu ersehen ist. Wurde nun die O_2-Kapazität durch Licht ausgetrieben, dann verdunkelt und nach verschiedenen Dunkelintervallen wieder belichtet, so zeigte sich in der

* Diese Größe hat nichts zu tun mit der Maximalgeschwindigkeit der O_2-Entwicklung bei Lichtsättigung, die oft als „photosynthetische Kapazität" bezeichnet worden ist und die eine Geschwindigkeit pro Volumeninheit ist, während unsere Kapazität eine O_2-Menge pro Volumeinheit ist. — Der Ausdruck „O_2-Kapazität" soll nicht bedeuten, daß die beiden O-Atome in RH_4O_2 bereits vor der Einwirkung des Lichts miteinander verbunden sind.

Tat, daß nach nahezu 30 Dunkelminuten die volle O_2-Kapazität wieder hergestellt war (Abb. 4).

Da es also die induzierte Atmung ist, die die im Licht verbrauchte O_2-Kapazität immer wieder herstellt, so muß diese Wiederherstellung ausbleiben, wenn man den Zellen den O_2 entzieht. Gelber Phosphor im Gasraum ist dabei nicht, wie wir früher annahmen[3], nötig, sondern es genügt, 100 mm^3 Zellen in den Manometriegefäßen mit 10 Vol% CO_2-Argon zu sättigen und im Dunkeln zu warten, bis das Manometer keine negativen Drucke mehr anzeigt, was im allgemeinen nach 30 Min. erreicht ist. Belichtet man dann wie bei Bestimmungen der Kapazität nach Abb. 4, so erhält man keine positiven Drucke, wie lange man die Dunkelzeiten auch ausdehnen mag.

Wie O_2-Mangel wirkt Blausäure. $n/10000$-Blausäure, bei O_2-Drucken von 20 bis 30% einer Atmosphäre, verhindert die Wiederherstellung der O_2-Kapazität ebenso wie O_2-Mangel, woraus hervorgeht, daß es nicht der *Druck* des O_2, sondern *eine chemische Reaktion* des O_2 ist, welche die Kapazität wiederherstellt.

Man kann sich keine besseren Beweise unserer Gleichungen denken, als diese Experimente: die Wiederherstellung der O_2-Kapazität in der Abklingungszeit der induzierten Atmung und die Nichtwiederherstellung der Kapazität, wenn die induzierte Atmung durch O_2-Mangel oder durch Blausäure gehemmt ist.

Anmerkung. Die induzierte Atmung, die nach unseren Messungen und nach unsern Gleichungen immer mindestens das Doppelte der stationären Photosynthese beträgt, kann heute mit fast beliebig großen manometrischen Ausschlägen gemessen werden. Die induzierte Atmung bestreiten, wäre heute dasselbe, als ob man die Sauerstoffkapazität des Blutes bestreiten wollte. Kein Isotop, weder ^{14}C noch ^{18}O, kann an der Tatsache der induzierten Atmung und ihrer Äquivalenz zur Photosynthese etwas ändern. Wenn die Kohlensäure $^{14}CO_2$ im Licht reduziert wird, so ist gemäß unsern Gleichungen der Kohlenstoff, der verbrennt, nicht, wie *Weigl* annimmt (Amer. Chem. Soc. 73, 5058 [1951]), der Kohlenstoff ^{12}C, sondern es ist der Kohlenstoff ^{14}C. Wenn der schwere Sauerstoff ^{18}O im Dunkel veratmet wird, während das gewöhnliche Wasser $H_2{}^{16}O$ im Licht gespalten wird, so ist es nicht der schwere Sauerstoff ^{18}O, wie *Brown* glaubt (J. Bot. 40, 719 [1953]), sondern es ist der gewöhnliche Sauerstoff ^{16}O, der im Licht veratmet wird, da in der belichteten Chlorella kein Gasgleichgewicht und somit auch kein Isotopen-Gleichgewicht herrscht. — Im übrigen ist es klar, daß die Entdeckung der großen induzierten Atmung die Deutung vieler älterer Photosynthese-Versuche ändern kann. Wenn man z. B. bald nach Einsetzen der Belichtung in Chlorella irgendein Zwischenprodukt findet, so darf man heute nicht mehr ohne weiteres daraus schließen, daß dies ein Zwischenprodukt der Photosynthese sei, sondern man wird daran denken müssen, daß es ein Zwischenprodukt der induzierten Atmung sein könnte.*

1. Versuchsmedium, pH, Gasdrucke

Unser Versuchsmedium bei der Entdeckung der Quantenausbeute 1[4] war Kulturmedium, dessen Nitrat durch NH_4Cl ersetzt war und dessen pH nach kurzer Versuchsdauer (wegen des Verbrauchs an NH_3 aus NH_4Cl) bereits pH 3,8 war. In einer späteren Arbeit[5] über die Quantenausbeute 1 war das Versuchsmedium dest. Wasser. In beiden Arbeiten also war das Versuchsmedium frei von Nitrat und

* *Zusatz 1961.* Die lichtinduzierte Atmung erklärt, daß sofort beim Einsetzen der Belichtung in den Radiogrammen die Zwischenprodukte der Sauerstoffatmung auftreten. Photosynthese ist also nicht, wie Calvin aus seinen Radiogrammen geschlossen hat, Umkehr der Atmung; sondern eine Teilreaktion der Photosynthese ist Atmung.

relativ sauer. Auf der Suche nach einem geeigneten Medium zur Bestimmung der O_2-Kapazität gingen wir von diesen Erfahrungen aus und fanden es günstig, nicht nur das Nitrat, sondern auch das Calcium aus dem Versuchsmedium fortzulassen, das dann die folgende Zusammensetzung hatte:

5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 2 g NaCl + 1000 cm^3 aus Quarz dest. Wasser, mit $n/1$-H_2SO_4 auf pH 3,75 angesäuert. Es schien nicht notwendig zu sein, diesem Versuchsmedium die bei der Züchtung verwendeten Mikroelemente zuzusetzen, doch sollte ein solcher Zusatz immer wieder geprüft werden.

Chlorella Pyrenoidosa aus der Sammlung von Professor HARDER (Göttingen), wie kürzlich beschrieben, gezüchtet, wurde in diesem Medium 2 mal gewaschen und dann zu der gewünschten Zelldichte aufgefüllt.

Der CO_2-Druck bei den manometrischen Messungen betrug 10%, der O_2-Druck 20—30% einer Atmosphäre. Das indifferente Gas war Stickstoff oder Argon.

Unter diesen Bedingungen betrug die Abklingungszeit der induzierten Atmung 25—30 Minuten. Die induzierte Atmung verlief also sehr langsam, wie es zur Messung der O_2-Kapazität erwünscht war.

Die 2-Gefäß-Methode war zur Messung der O_2-Kapazität notwendig, da mit dem O_2, der entwickelt wurde, immer gleichzeitig eine nahezu äquimolekulare Menge CO_2 absorbiert wurde.

2. Zellmenge

Da die O_2-Kapazität eine stöchiometrische Eigenschaft der Zellen ist, so erhält man bei der Messung der O_2-Kapazität um so größere manometrische Ausschläge, je größer die verwendeten Zellmengen sind. 100—200 mm^3 Zellen waren eine geeignete Zellmenge, die bei einer Kapazität von 200 mm^3 pro cm^3 20—40 mm^3 O_2 im Licht entwickelten. Während wir also heute die Photosynthese — die Reaktion [5] unsrer Gleichungen — mit möglichst dünnen Zellsuspensionen messen ($\sim$ 1 mm^3 Zellen pro cm^3), müssen die Zellmengen bei der Messung der O_2-Kapazität 15—30-mal so groß sein.

3. Blaugrün

Wegen der katalytischen Wirkung des blaugrünen Lichts haben wir bei den Messungen der O_2-Kapazität zu dem grünen oder roten Meßlicht, von dem 20 bis 50 mm^3 Quanten pro Minute eingestrahlt wurden, immer Blaugrün hinzugefügt, dessen eingestrahlte Intensität $\mathcal{J} \sim 1{,}0$ mm^3 Quanten pro Minute war. Als Quelle des Blaugrün diente eine 60-Watt-Jupiterlampe von Heraeus in Hanau, die mit Blaufilter in einer Entfernung von 45 cm von den Manometriegefäßen aufgestellt war. Es ist unwahrscheinlich, daß hierbei die maximale katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts schon erreicht wurde, da bei der großen Zelldichte das Blaugrün schon in $^1/_{10}$ oder $^1/_{20}$ der Schichtdicke der Zellsuspension absorbiert wurde.

4. „Time Lag"

Bei jedem Übergang von dunkel zu hell dauert es eine gewisse Zeit, bis der Strom des O_2, der im Dunkel aus dem Gasraum in die Suspensionsflüssigkeit und von

hier in die Zellen hineingeht, seine Richtung umkehrt und aus den Zellen in die umgebende Flüssigkeit und von hier aus in den Gasraum austritt. Durch große Schüttelgeschwindigkeit, die in unsern Versuchen 190 Exkursionen pro Minute betrug, kann diese „Nachwirkezeit" verkleinert, aber sie kann nie Null werden.

Wenn wir z. B. 100 mm³ Chlorella in unserm Versuchsmedium mit λ 546 mμ ($\mathcal{J}$ = 32,6 mm³ Quanten pro Minute, Absorption 89%) belichteten, fanden wir die folgenden Druckänderungen:

	im kleinen Gefäß $v = 16{,}88$ $v_F = 7{,}00$ (mm)	im großen Gefäß $v = 21{,}35$ $v_F = 7{,}00$ (mm)
10′ dunkel	— 5,0	— 2,5
1′ hell	+ 4,5	+ 2,5
1′ dunkel	*+ 1,5*	*+ 0,5*
5′ dunkel	— 5,0	— 3,0

Ein erheblicher Teil der durch das Licht bewirkten positiven Drucke kam also in der ersten Dunkelminute noch „nach", und es kam in dem kleinen Gefäß relativ mehr Druck nach als in dem großen Gefäß. Berechnet man $1/\varphi$ ohne Berücksichtigung der Nachwirkung, so erhält man $1/\varphi = 1{,}87$ und $\gamma = -0{,}96$, während man bei Berücksichtigung der Nachwirkung $1/\varphi = 1{,}23$ und $\gamma = -1{,}05$ erhält. Bei Nichtberücksichtigung findet man also sowohl γ als auch die Ausbeute zu niedrig.

Um hier Abhilfe zu schaffen, lesen wir bei allen manometrischen Versuchen, bei denen die Belichtungszeiten kurz sind, nicht sofort bei Beendigung der Hellzeit ab, sondern erst nach Ablauf einer auf die Hellzeit folgenden Dunkelminute. Wir lesen außerdem unsere Manometer nicht am Anfang der Hellzeit ab, sondern eine Minute *vor* Einsetzen der Belichtung, damit die Schüttelbewegung am Anfang der Hellzeit nicht unterbrochen werden muß.

Wenn wir also die Wirkung des Lichts in 1 Hellminute messen wollen, so ist die Zeitfolge 1′ dunkel 1′ hell 1′ dunkel. Wenn wir die Wirkung des Lichts in n Hellminuten messen wollen, so ist die Zeitfolge 1′ dunkel n' hell 1′ dunkel. Wenn wir die Lichtwirkung für drei aufeinanderfolgende Hellminuten messen wollen, so messen wir niemals nach 1′ und nach 2′ und nach 3′ hell, sondern wir machen 3 Versuche mit der Zeiteinteilung 1′ dunkel, 1′ hell, 1′ dunkel; 1′ dunkel, 2′ hell, 1′ dunkel; 1′ dunkel, 3′ hell, 1′ dunkel, wobei dann zur Berechnung des Quantenbedarfs die Atmung sowohl in den begrenzenden Dunkelminuten als auch in den Hellminuten berücksichtigt werden muß.

Das Verfahren wird erläutert durch die Abb. 1 u. 2 sowie durch die Protokolle II u. III. Die so erreichte Eliminierung des „Time lag" ist eine wesentliche Verbesserung der Manometrie kurzer Belichtungszeiten und hat die Ausbeuten der Photodissoziation wesentlich verbessert.

5. Thermoeffekte

Da wir beim Einsetzen der Belichtung größere positive Druckveränderungen finden als später und da wir beim Einsetzen der Verdunkelung größere negative Druckveränderungen finden als später — wobei „Time lag" als eliminiert zu denken ist —, so sind wir gefragt worden, ob diese Effekte nicht von Erwärmungen und Abkühlungen herrühren.

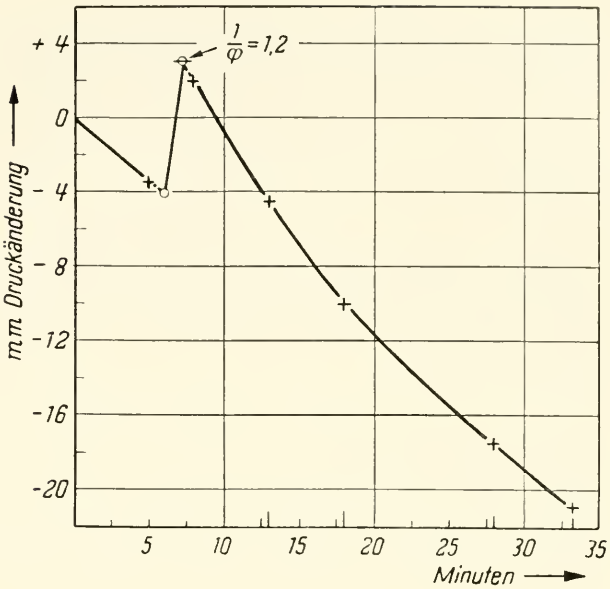


Abb. 1. Bestimmung des Quantenbedarfs der Photodissoziation mit Licht der Wellenlänge 644 mμ und der Intensität 36 mm³ Quanten pro Minute. Belichtungszeit *1 Minute*. ○ Beginn der Belichtung; ⌀ Ende der Belichtung; + manometrische Ablesungen. Daten in Protokoll II

Enthält ein Manometriegefäß 7 cm³ Zellsuspension und werden in diese 7 cm³ pro Minute 2 μMole Quanten, das sind im Mittel 2 · 0,05 Kalorien, eingestrahlt und in ihnen absorbiert; wird ferner diese Energie nicht für die Photodissoziation verbraucht, sondern in Wärme umgewandelt; und findet, trotz der Schüttelfrequenz von 190 pro Min., kein Wärmeaustausch mit dem Thermostatenwasser

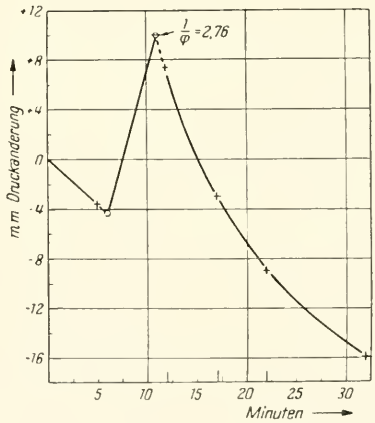


Abb. 2. Bestimmung des Quantenbedarfs der Photodissoziation mit Licht der Wellenlänge 644 mμ und der Intensität 36 mm³ Quanten pro Minute. Belichtungszeit *5 Minuten*. ○ Beginn der Belichtung; ⌀ Ende der Belichtung; + manometrische Ablesungen. Daten in Protokoll II.

statt: dann könnte die Erwärmung in den Manometriegefäßen $^1/_{70}{}^0$C betragen und die Druckänderung könnte in 1 Min. + 0,5 mm Brodie betragen; während wir bei der Messung der Photodissoziation in der ersten Hellminute etwa die 10fache Druckänderung finden. In Wirklichkeit jedoch wird die eingestrahlte Energie fast vollständig für die Photodissoziation verbraucht; und in Wirklichkeit wird eingestrahlte Wärme wegen der großen Schüttelgeschwindigkeit an das Thermostatenwasser abgeführt, so daß auch nicht kleine Bruchteile der gefundenen Effekte Ther-

moeffekte sein können. Das gleiche folgt aus allen Versuchen, bei denen beim Einsetzen der Belichtung *keine* positiven Drucke auftreten — bei alkalischer Reaktion, bei Mangel an CO_2, bei Mangel an O_2, bei Gegenwart von HCN usw.

Um diese Überlegungen zu bestätigen, ersetze man in den Manometriegefäßen die Zellsuspension durch 7 cm³ einer das Licht vollständig absorbierenden Methylenblaulösung (20 mg Methylenblau Merck + 20 cm³ Versuchsmedium pH 3,8, wovon 7 cm³ in den Manometriegefäßen die Wellenlänge 546 mμ vollständig absorbieren), sättige mit 10 Vol.-Proz. Kohlensäure-Luft und belichte wie bei den Messungen der Photodissoziation mit 546 mμ der Intensität 20—50 mm³ Quanten pro Minute. Man findet dann bei Zusatz oder Fortnahme des Lichts keine Druckänderungen.

6. Sauerstoff-Kapazität

Bei den Bestimmungen der O_2-Kapazität ist es von entscheidender Bedeutung, daß die Zellen zunächst 30 Min. im Dunkeln oder in ganz schwachem Blaugrün gehalten werden, damit, gemäß unsern Gleichungen, die O_2-Kapazität durch die Energie der Atmung aufgebaut wird. Erst dann belichtet man, und zwar mit 35—60 mm³ Quanten pro Minute, die im Rot vollständig und im Grün fast vollständig von den 100—200 mm³ Zellen absorbiert werden. Die Dauer der Belichtung beträgt dabei 10 Minuten. Bereits in den ersten 5 Min. wird die Kapazität im wesentlichen als positiver Druck entwickelt. In den zweiten 5 Min. hat man dann die stationäre Photosynthese, deren viel kleinere Druckentwicklung von der Druckentwicklung in den ersten 5 Minuten abgezogen wird. Die Differenz zwischen anfänglicher und stationärer O_2-Entwicklung ist die O_2-Kapazität. Zur Erläuterung dient das Protokoll I, in dem 2 Versuche genau beschrieben sind. Insbesondere beachte man, daß die O_2-Kapazität unabhängig von den angewandten Lichtintensitäten ist.

Die Kapazitätsbestimmung wurde stets mit einer Chlorophyllbestimmung verbunden, indem aus den Versuchszellen ein Methanolextrakt hergestellt wurde, dessen Lichtschwächung i_0/i bei 546 mμ die Chlorophyllkonzentration c ergab:

$$c = \frac{\ln \frac{i_0}{i}}{\beta \cdot d} = \frac{\ln \frac{i_0}{i}}{9{,}3 \cdot d} \left[\frac{\text{mgr}}{\text{cm}^3}\right].$$

In dem ersten Versuch des Protokolls I wurden aus 200 mm³ 2tägiger Chlorella (Chlorophyllgehalt 6,4%) 48 mm³ O_2 entwickelt, während der Chlorophyllgehalt 79,5 mm³ betrug. Es war also $\frac{O_2\text{-Kapazität}}{\text{Chlorophyll}} = 0{,}6.$

In dem zweiten Versuch des Protokolls I wurden aus 200 mm³ 1tägiger Chlorella (2,34% Chlorophyll) 31,5 mm³ O_2 entwickelt, während der Chlorophyllgehalt 29,2 mm³ betrug. Es war also $\frac{O_2\text{-Kapazität}}{\text{Chlorophyll}} = 1{,}08.$

Bei der Bestimmung der O_2-Kapazität ist darauf zu achten, daß der CO_2-Druck der in der allgemeinen Versuchsanordnung vorgeschriebene von $^1/_{10}$ einer Atm.

ist. Es ist experimentell wie theoretisch in gleichem Maße wichtig, daß man bei niedrigen CO_2-Drucken kleinere O_2-Kapazitäten findet.

Auch der vorgeschriebene O_2-Druck ist einzuhalten. Um sicher zu gehen, haben wir für den O_2-Druck 20—30% einer Atm. vorgeschrieben.

7. Quantenbedarf der Photodissoziation

Bei der Bestimmung des Quantenbedarfs ist zu berücksichtigen, daß die Atmung sehr erheblich ansteigt, wenn man belichtet. In den Versuchen der Abb. 1 und 2 war die Atmung nach 1 Hellminute bereits verdoppelt und nach 5 Hellminuten verdreifacht. Die gleichen Abbildungen erläutern graphisch, wie man die Atmung bei der Berechnung des Quantenbedarfs berücksichtigt.

Wir berechnen in dieser Weise den Quantenbedarf für die Austreibung des gesamten O_2 nach Abb. 3 und finden (O_2 aus 100 mm³ Zellen mit $\mathcal{J}_{644} = 35{,}8\,mm^3$ Quanten pro ′ ausgetrieben):

Tab. 1.

Belichtungszeit (Min.)	x_{O_2} (mm³)	x_{CO_2} (mm³)	γ	$1/\varphi$ *
0,5	+ 16	— 17,8	— 1,19	*1,09*
1,0	+ 29	— 33,8	— 1,17	*1,20*
3,0	+ 49,5	— 55	— 1,11	*2,11*
5,0	+ 63	— 69	— 1,10	*2,76*

* $1/\varphi = \frac{\mathcal{J} \cdot A \cdot t}{x_{O_2}}$ $\mathcal{J}$ = eingestrahlte Intensität, A = absorbierter Bruchteil, t = Belichtungszeit, x_{O_2} = in der Zeit t entwickelter Sauerstoff

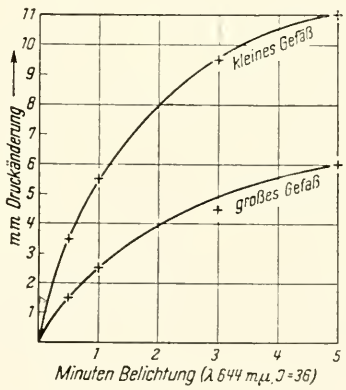


Abb. 3. Austreibung des O_2 aus 100 mm³ Zellen mit Licht der Wellenlänge 644 mμ und der Intensität 36 mm³ Quanten pro Minute. Daten in Protokoll II.

Die Quantenausbeute war also zunächst 1 und sank dann in dem Maß, als der dissoziierbare O_2 ausgetrieben wurde. War kein dissoziierbarer O_2 mehr vorhanden, so war die Quantenausbeute Null.

Nehmen wir aber an, daß der Träger des O_2 mit dem Chlorophyll verbunden ist und daß nur Licht, das von dem verbundenen Chlorophyll absorbiert wird, O_2

abspaltet, so ist nach der Belichtungszeit t von dem verbundenen Chlorophyll die Energiemenge

$$\mathcal{J} A \int_0^t \frac{C - c}{C} \, d t$$

absorbiert worden, wo J die eingestrahlte Intensität ist, A der Bruchteil von $\mathcal{J}$, den das *gesamte* Chlorophyll absorbiert, C die O_2-Kapazität und c die zur Zeit t ausgetriebene O_2-Kapazität.

Das Integral $\int_0^t \frac{C - c}{C} \, d t$ findet man leicht durch Ausmessung der Flächen der Abb. 3. Setzt man es an Stelle von t in die Berechnung von $1/\varphi$ ein, so erhält man:

Tab. 2.

Belichtungszeit (Min.)	x_{O_2} (mm³)	$1/\varphi$ *
0,5	+ 16	0,93
1,0	+ 29	0,87
3,0	+ 49,5	0,95
5,0	+ 63	0,88
		Mittel 0,91

$$* \; 1/\varphi = \frac{\mathcal{J} A \int_0^t \frac{C - c}{C} \, d t}{x_{O_2}}$$

d. h., man findet für den ganzen Verlauf der Austreibung der Kapazität nahezu die Quantenausbeute 1.

Wie man nun das Absinken der Ausbeute mit fortschreitender Austreibung der Kapazität auch erklären mag, jedenfalls lehren die Versuche, daß man die Quantenausbeute 1 nur findet, wenn die Zellen ihre volle O_2-Kapazität besitzen. Sinkt die Kapazität, weil die Lichtintensität zu groß und die induzierte Atmung zu klein ist, so sinkt auch die Ausbeute.

8. Wiederherstellung der Sauerstoff-Kapazität

Wie man aus den Abb. 1 und 2 sieht, dauerte es unter den Bedingungen unserer Versuche 25 bis 30 Min., bis nach Verdunkelung die durch das Licht induzierte Atmung wieder abgeklungen war. Unter den gleichen Bedingungen untersuchten wir, wie lange es nach Verdunkelung dauert, bis eine im Licht verbrauchte O_2-Kapazität vollständig wiederhergestellt war. Wir fanden eine „Erholungszeit" von 25—30 Min., also die Abklingungszeit der induzierten Atmung.

Bei einem Versuch, der in Protokoll III mit allen experimentellen Einzelheiten beschrieben ist, wurden 100 mm³ Chlorella (mit der Wellenlänge 644 mμ der Intensität $\mathcal{J}$ = 33,4 mm³ Quanten pro ') 1 Min. lang belichtet. Dann wurde ver-

dunkelt und nach verschiedenen Dunkelzeiten wiederum 1 Min. lang mit der gleichen Intensität belichtet. Wir fanden, daß nach den verschiedenen Dunkelintervallen die folgenden positiven Drucke in 1 Hellminute entstanden:

Tab. 3.

Dunkelintervall (Min.)	Positive Drucke in 1 Hellminute	
	im kleinen Gefäß (mm)	im großen Gefäß (mm)
5	+ 1,1	+ 0,5
10	+ 2,5	+ 1,25
15	+ 4,0	+ 1,5
20	+ 4,5	+ 2,0
30	+ 5,5	+ 2,5
145	+ 5,5	+ 2,0

Dieser wichtige Versuch ist in Abb. 4 graphisch dargestellt. Er beweist, daß es die induzierte Atmung ist, die den dissoziierbaren O_2 immer von neuem bildet. Natürlich kann dann bei Mangel an O_2 die O_2-Kapazität nicht wiederhergestellt werden, eine Konsequenz, die sich leicht bestätigen läßt. Man hat dazu nicht nötig,

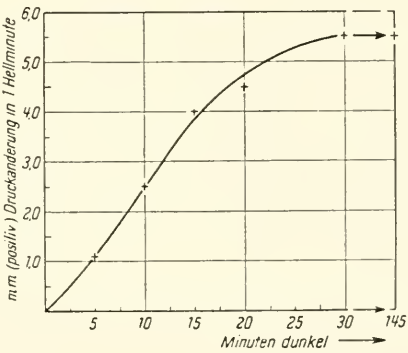


Abb. 4. Wiederherstellung der O_2-Kapazität im Dunkeln. Abszissen: Dunkelintervalle zwischen den Belichtungen. Ordinaten: positive Drucke in der Belichtungszeit (1 Min.). Daten in Protokoll III.

die letzten Spuren von O_2 mit gelbem Phosphor aus dem Gasraum zu entfernen, sondern es genügt, die Zellen mit 10 Vol.-Proz. CO_2-Argon zu sättigen und so lange zu warten, z. B. 20 Minuten, bis das Manometer im Dunkeln keine negativen Drucke mehr anzeigt. Belichtet man dann mit Quantenintensitäten von 30 bis 50 mm^3 Quanten pro Minute, so erhält man keine positiven Drucke, während die positiven Drucke, wieder auftreten, wenn man 10 Vol.-Proz. Kohlensäure-*Luft* einleitet.

9. Blausäure

Würde HCN die Atmung der Chlorella hemmen, so wäre es nach dem vorigen Abschnitt selbstverständlich, daß HCN die O_2-Kapazität zum Verschwinden bringt. Tatsächlich hemmt HCN die Atmung der autotrophen Chlorella *nicht*, und doch findet man, daß HCN die O_2-Kapazität zum Verschwinden bringt.

Wurde HCN zu Zellen, die in dem Versuchsmedium pH 3,8 suspendiert waren, hinzugefügt, so wurden die folgenden Atmungswerte und respiratorischen Quotienten gefunden (100 mm^3 Zellen in 7 cm^3, Gasraum 10 Vol.-Proz. CO_2 und 20—30 Vol.-Proz. O_2):

Tab. 4.

HCN-Konzentration	100 mm^3 Zellen verbrauchten pro Stde. mm^3 O_2	CO_2/O_2
0	154	— 1,2
0	126	— 1,0
$n/35000$	190	— 1,09
$n/10000$	138	— 1,0
$n/3500$	126	— 0,95
$n/350$	130	— 1,0

Die Atmung wurde also durch so hohe HCN-Konzentrationen wie $n/350$ nicht gehemmt. Dabei verbrannte die HCN nicht merklich, da bei der Verbrennung der HCN der Quotient $CO_2/O_2 = -2$ hätte sein müssen, während $CO_2/O_2 = -1$ gefunden wurde.

In keiner der angeführten HCN-Konzentrationen wurden bei Belichtung von 100 mm^3 Zellen positive Drucke erhalten, in keiner der angeführten HCN-Konzentrationen also war eine O_2-Kapazität nachweisbar. Bei der niedrigsten HCN-Konzentration ($n/35000$) kamen dabei 0,2 μMole HCN auf 100 mm^3 Zellen. Da die normale O_2-Kapazität von 100 mm^3 Zellen 1,2 μMole O_2 ist, so kann die HCN den dissoziierbaren O_2 nicht durch eine zur Kapazität *stöchiometrische* Reaktion zum Verschwinden bringen; sondern die Wirkung der HCN muß eine *antikatalytische* sein.

In erster Linie wird man an eine Hemmung der induzierten Atmung denken. Erinnern wir uns daran, daß wir früher fanden[7], daß die durch Zucker induzierte Atmung der Chlorella durch HCN gehemmt wird; daß ferner die Blackmansche Reaktion durch $n/10000$-Blausäure gehemmt wird[8], so ist es mehr als wahrscheinlich, daß Blausäure die induzierte Atmung hemmt und daß sie dadurch die O_2-Kapazität zum Verschwinden bringt.

Protokoll I. Bestimmung der Sauerstoff-Kapazität der Chlorella

Erster Versuch. 2tägige Zellen. Chlorophyllgehalt 6,4%. Die Zellen wurden 2 mal in dem Versuchsmedium (Abschnitt 1) gewaschen, dann auf die Konzentration 200 mm^3 in 7 cm^3 gebracht und in die Manometriegefäße eingefüllt. Die Gefäße waren: $v = 16{,}88$, $v_F = 7{,}0$, $v = 21{,}35$, $v_F = 7{,}0$;

$$x_{O_2} = H' \times 8{,}05 - H \times 10{,}24 \quad (mm^3);$$
$$x_{CO_2} = -H' \times 11{,}49 + H \times 16{,}57 \quad (mm^3).$$

20°. Schüttelfrequenz 190 pro Minute. Gasraum 10 Vol.-Proz. CO_2 in Luft. Die beobachteten Drucke waren:

Immer Jupiterlampe + 2 mm B.G. 23 in 45 cm Abstand J = 1,2 (mm³ Quanten pro ′).		Großes Gefäß H (mm)	Kleines Gefäß H' (mm)
—	10′ bg*	vor	vor
—	15′ bg	— 9,0	— 18,0
—	5′ bg	— 2,5	— 4,0
+ λ 644 J = 59,3 (mm³ Quanten pro ′)	2,5′ bg	+ 7,5 } + 14 } H + 12	+ 14,5 } + 24,5 } H' + 21,5
59,8	2,5′ bg	+ 6,5	+ 10,0
59,8	5,0′ bg	+ 2,0	+ 3,0
59,8	5,0′ bg	+ 2,0	+ 3,0

*bg = Blaugrün

x_{O_2} = + 48 mm³ } γ — 0,96
x_{CO_2} = — 46 mm³

200 mm³ Zellen enthielten 3,2 mg = 3,56 μ Mole = 79,5 mm³ Chlorophyll.

$$\frac{O_2\text{-Kapazität}}{\text{Chlorophyll}} = \frac{48}{79,5} = 0,6.$$

Immer Jupiterlampe + 2 mm G.B. 23 in 45 cm Abstand. J = 1,2 (mm³ Quanten pro ′).		Großes Gefäß H (mm)	Kleines Gefäß H' (mm)
—	25′ bg*	vor	vor
—	5′ bg	— 6,0	— 10,0
+ λ 644 J = 37,5	2,5′ bg	+ 4,0 } H + 6 mm	+ 7,0 } H' + 11,5 mm
37,5	2,5′ bg	+ 0,5	+ 1,0
37,5	5,0′ bg	— 1,5	— 3,5 x_{O_2} + 29,6 } γ—1,0
	5′ bg	— 9,0	— 16,5 x_{CO_2}—30
—	20′ bg	— 17,0	— 32,0
—	5′ bg	— 4,0	— 7,5
—			
+ λ 644 J = 59,5	2,5′ bg	+ 5,5 } H + 6,0	+ 10
59,5	2,5′ bg	+ 1,0	+ 3,5 H' + 12,0
59,5	5,0′ bg	+ 0,5	+ 1,5 x_{O_2} + 33,5 } γ—1,08
			x_{CO_2}—36,0

*bg = Blaugrün

Mittel der O_2-Kapazität 31,5 mm³

200 mm³ Zellen enthielten 1,17 mg = 1,305 μ Mole = 29,2 mm³ Chlorophyll

$$\frac{O_2\text{-Kapazität}}{\text{Chlorophyll}} = \frac{31,5}{29,2} = 1,08$$

Zweiter Versuch. 1tägige Zellen. Chlorophyllgehalt 2,34%. Vermehrung von 15 auf 142 mm³. Alles übrige wie im ersten Versuch. Die beobachteten Drucke sind aus der obenstehenden Tabelle ersichtlich.

Man beachte, daß die stationäre Photosynthese bei kleinen Lichtstärken wegen der großen Atmung negativ ist und dann zu den positiven Drucken der ersten 5 Min. addiert werden muß, während bei größeren Lichtstärken die stationären Drucke positiv sind und deshalb von den positiven Drucken der ersten 5 Min. abgezogen werden müssen.

Protokoll II (*Versuch vom* 5. 5. 1954). *Bestimmung des Quantenbedarfs der Photodissoziation*

2tägige Chlorella-Kultur. Saat 30, Ernte 714 mm³ Zellen. 2 mal in dem Versuchsmedium (s. Abschn. 1) gewaschen und dann auf 100 mm³ Zellen pro 7 cm³ konzentriert. Die Absorption des Meßlichts wurde in der Ulbrichtschen Kugel bestimmt und betrug 97 Prozent. Es wurde ohne Unterbrechung mit Blaugrün be-

Tabelle 5

	mm Brodie		$1/\varphi$ der Photodissoziation	
	Kleines Gefäß	Großes Gefäß		
5′*bg	— 3,5	— 2,5		
26′bg	—20,5	—11,0		
			+ 5,5	+ 2,5
5′bg	— 3,5	— 1,5	0,7	0,3
1′ 1_x′ 1′	+ *5,5*	+ *2,5*	1,0	0,45
5′bg	— 6,5	— 3,0	1,3	0,60
			H′ + 8,5	*H* + 3,85
5′bg	— 5,5	— 2,5	x_{O_2} + 29	x_{CO_2} — 33.8
			γ — 1,17	$1/\varphi$ = *1.20*
10′bg	— 7,5	— 4,5		
			+ 11,0	+ 6,0
			0,7	0,3
			1,0	0,45
5′bg	— 3,5	— 1,5	1,4	0,65
1′ 5_x′ 1′	+ *11,0*	+ *6,0*	1,6	0,75
5′bg	— 10,5	— 5,0	1,7	0,80
			2,1	1,0
5′bg	— 6,0	— 3,5	2,0	0,95
			H′ + 21,7	*H* + 10,8
			x_{O_2} + 63	x_{CO_2} — 69
			γ — 1,10	$1/\varphi$ = *2,8*
10′bg	— 7,0	— 3,5		
			+ 9,5	+ 4,5
5′bg	— 2,5	— 1,5	0,5	0,3
1′ 3_x′ 1′	+ *9,5*	+ *4,5*	0,9	0,45
5′bg	— 8,5	— 4,0	1,4	0,65
			1,6	0,75
			1,7	0,80
			H′ = + 15,6	*H* = + 7.45
5′bg	— 5,0	— 2,5	x_{O_2} + 49,5	x_{CO_2} — 55
10′bg	— 7,0	— 4,0	*γ* — 1,11	$1/\varphi$ = *2,11*
			+ 3,5	+ 1,5
5′bg	— 3,0	— 1,5	0,6	0,3
1′ $\frac{1}{2}$ x 1′	+ *3,5*	+ *1,5*	0,37	0,2
5′bg	— 3,5	— 2,5	0,70	0,5
			H′ = + 5,17	*H* = + 2,5
15′bg	— 8,5	— 4,5	x_{O_2} + 16	x_{CO_2} — 17,8
5′bg	— 3,0	— 1,0	*γ* — 1,11	$1/\varphi$ = *1,09*

*bg = Blaugrün, J = 0,3. x = Meßlicht, J_{644} = 35,8.

lichtet, dessen eingestrahlte Intensität $\mathcal{J} = 0{,}3$ mm³ Quanten pro Minute betrug. Das Meßlicht war 644 mμ mit einer Interferenzscheibe aus einer Cd-Hg-Lampe isoliert. Die eingestrahlte Intensität betrug $\mathcal{J} = 35{,}8$ mm³ Quanten pro Minute. Die Belichtungszeiten mit dem Meßlicht sind durch ein Kreuz gekennzeichnet. 1′ 1′ x 1′ bedeutet also, daß 3 Min. mit Blaugrün belichtet wurde und daß in der mittleren Min. das Meßlicht hinzugefügt wurde.

Manometrie. 20°C Gasraum 10 Vol.-Proz. CO_2-Luft. Schüttelfrequenz 190 pro Minute. Gefäße

$$v = 16{,}88,\ v_F = 7{,}0 \text{ und } v = 21{,}35,\ v_F = 7.0$$

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}05 - H \cdot 10{,}24\ [\text{mm}^3],$$
$$x_{CO_2} = -H' \cdot 11{,}49 + H \cdot 16{,}57\ [\text{mm}^3].$$

Tabelle 6

Nach-Ausgleich	Kleines Gefäß (mm)		Großes Gefäß (mm)		$1/\varphi$ der Photodissoziation
5′*bg	— 4,5		— 2,5		
1′ 1′x 1′	+ 4,0		+ 1,5		
5′bg	— 7,0		— 3,0		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *0,5*		+ *0,5*		
5′bg	— 8,0		— 3,0		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *1,5*	+ Drucke Mittel + 1,13	+ *0,5*	+ Drucke Mittel + 0,5	
5′bg	— 8,0		— 4,5		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *1,0*		+ *0,5*		
5′bg	— 8,0		— 4,0		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *1,5*		+ *0,5*		
5′bg	— 7,5		— 4,0		
5′bg	— 5,5		— 3,0		
5′bg	— 5,0		— 2,5		
10′bg	— 7,5		— 5,0		
5′bg	— 3,5		— 1,5		$H' + 8{,}5$; $H + 3{,}85$
1′ 1′$_x$ 1′	+ *5,5*		+ *2,5*		$x_{O_2} + 29$; $x_{CO_2} - 34$
5′bg	— 6,5		— 3,0		$\gamma - 1{,}17$; $1/\varphi = 1{,}11$
5′bg	— 5,5		— 3,0		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *2,5*		+ *1,5*		
5′bg	— 5,5		— 2,0		
5′bg	— 5,0		— 2,0		
1′ 1′$_x$ 1′	+ *2,5*		+ *1,0*		
5′bg	— 5,5		— 3,0		
5′bg	— 5,0		— 2,0		
5′bg	— 3,5		— 2,0		
1′ 1′$_x$′ 1′	+ *4,0*		+ *1,5*		
5′bg	— 7,0		— 3,0		
10′bg	— 8,0		— 3,5		
5′bg	— 3,0		— 1,5		
1′ 1$_x$′ 1′	+ *4,5*		+ *2,0*		
5′bg	— 5,0		— 2,5		
75′bg	—44,5		—23		
60′bg	Nicht gemessen		Nicht gemessen		
5′bg	— 1,5		— 0,5		$H' + 7{,}3$; $H + 2{,}9$
1′ 1$_x$′ 1′	+ *5,5*		+ *2,0*		$x_{O_2} + 29$; $x_{CO_2} - 36$
5′bg	— 4,5		— 2,5		$\gamma - 1{,}24$; $1/\varphi = 1{,}12$

* bg = Blaugrün, $\mathcal{J} = 0{,}3$. $_x$ = Meßlicht, $\mathcal{J}_{644} = 33{,}4$.

Protokoll III (*Versuch vom* 10. 5. 1954). *Wiederherstellung der Sauerstoff-Kapazität im Dunkeln*

Unterscheidet sich von dem Versuch des Protokolls I dadurch, daß nicht die Belichtungszeiten, sondern die Dunkelintervalle zwischen den Belichtungszeiten variiert wurden. Im übrigen alles wie im Versuch des Protokolls II.

Die Wiederherstellung der O_2-Kapazität ist nur durch die positiven Drucke gemessen worden, die in der Meßperiode 1′ 1′ x 1′ erhalten wurden. Die Kurve der Abb. 4 ist mit diesen im kleinen Gefäß erhaltenen positiven Drucken gezeichnet worden.

Aus den positiven Drucken und den durch die Atmung bewirkten negativen Drucken — vor, nach und während der Belichtung — ergab sich wie in Protokoll II der Quantenbedarf der Photodissoziation.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. angew. Chem. 66 (1954), 493.
2 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 667.
3 Warburg, O., Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 55 (1951), 447.
4 Burk, D., und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12.
5 Warburg, O., und Geleick, H., Z. Naturforschg. 6b (1951), 417.
6 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.
7 Emerson, R., J. gen. Physiol. 8 (1927), 469.
8 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.

31 Versuche über die Sauerstoff-Kapazität der Chlorella*

Von Otto Warburg und Walter Schröder

Versuche über die Wirkung von O_2-Mangel und von Phenanthrolin auf die O_2-Kapazität der Chlorella. — Beziehungen der O_2-Kapazität der Chlorella zum Chlorophyll.

Die O_2-Kapazität** der Chlorella[1] ist ihr Gehalt an photodissoziierbarem O_2, der durch kurze starke Belichtung unter Bedingungen bestimmt wird, unter denen die Nachbildung der Kapazität langsam ist. Diese O_2-Kapazität der Chlorella hängt von ihrem Chlorophyllgehalt ab und ist bis zu den Chlorophyllgehalten, die 4%, bezogen auf Trockengewicht, nicht übersteigen, etwa gleich dem Chlorophyllgehalt. Wenn zum Beispiel 1000 cmm Chlorella 10 μMole Chlorophyll enthalten, so enthalten sie etwa 10 μMole an photodissoziierbarem O_2, *woraus man schließen muß, daß der O_2, der bei der Photosynthese aus den grünen Zellen entwickelt wird, aus dem Chlorophyll entwickelt wird.*** Wir werden untersuchen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der O_2-Kapazität und dem isocyclischen Ring des Chlorophylls, und wir erinnern uns dabei der Entdeckung von Conant[2], daß der isocyclische Ring des Chlorophylls unter gewissen Bedingungen 1 Mol. O_2 absorbiert; und der Vermutung von H. Fischer[2a], daß das Kohlenstoffatom 10 des isocyclischen Rings fähig ist, ein Peroxyd zu bilden.

Die O_2-Kapazität der Chlorella, die so groß ist wie die O_2-Kapazität des Blutes, ist dadurch entdeckt worden, daß es gelang, die Nachbildung der Kapazität so zu verlangsamen, daß die Austreibung der Kapazität und ihre Nachbildung zeitlich getrennt werden. Bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen wird die O_2-Kapazität mit kontinuierlichem Licht in etwa 5 Min. ausgetrieben, während die Nachbildung der Kapazität 10 bis 20 Min. in Anspruch nimmt.

Das Medium bei diesen Versuchen war die Salzlösung, in der die Chlorella kultiviert wird, die aber als Stickstoffquelle Ammoniumchlorid an Stelle von Nitrat enthielt, die kein Calcium enthielt, deren pH 3,8 an Stelle von 4,3 war und die mit 10% anstatt mit 5% CO_2 gesättigt war. Wir überzeugten uns davon, daß diese Abweichungen von der normalen Zusammensetzung der Kulturlösung die Zellen nicht schädigten. Wurden die Zellen nach der Austreibung der Kapazität in das normale Kulturmedium zurückgebracht, so vermehrten sie sich unter den normalen Kulturbedingungen ohne Verzögerung gegenüber den Kontrollen.

1. Sauerstoffmangel

Betrachtet man die Gleichungen[1] der Austreibung und der Nachbildung der O_2-Kapazität, so sieht man, daß zur Nachbildung der O_2-Kapazität O_2 notwendig ist.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955): 639

** *Zusatz 1961.* Dieser Satz wäre heute folgendermaßen auszudrücken: „daß der O_2, der bei der Photosynthese aus grünen Zellen entwickelt wird, aus dem Photolyten entwickelt wird, der stöchiometrisch mit dem Chlorophyll verbunden ist.“ (Vergl. Arbeit 76 dieses Buchs.)

Treibt man also aus einer Chlorellasuspension den O_2 im Licht aus, entzieht dann den Zellen im Licht den O_2 und verdunkelt wieder, so kann die induzierte Atmung nicht ablaufen; es kann deshalb keine Kapazität nachgebildet werden; und es kann deshalb bei einer folgenden Belichtung kein O_2 ausgetrieben werden; während bei Gegenwart von O_2 die O_2-Kapazität beliebig oft ausgetrieben werden kann, wenn man in Dunkelintervallen genügend Zeit zur Nachbildung der Kapazität gibt.

Ein Versuchsbeispiel ist in Abb. 1 graphisch dargestellt, in der die beobachteten Druckänderungen als Funktion der Hell- und Dunkelzeiten eingezeichnet sind. Zunächst wurden die Zellen in einem Manometriegefäß mit 10 Vol.-Proz. CO_2 in Argon gesättigt, $2^1/_2$ Stdn. im Thermostaten bei 20^0 bewegt. Dann wurde 5 Min. belichtet. Wie man aus der Abbildung sieht, entstanden im Licht in summa keine Drucke; und es entstanden beim Verdunkeln nur minimale negative Drucke. Wurde dann das O_2-freie Gasgemisch ersetzt durch 10 Vol.-Proz. CO_2, 30 Vol.-Proz. O_2 und 60 Vol.-Proz. Argon und nach 30 Min. Atmung im Dunkeln genau wie vor-

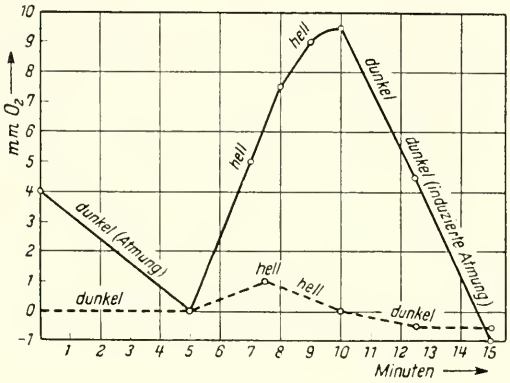


Abb. 1. Beobachtete Druckänderungen in mm Brodie. - - - - - - Anaerob, ———— aerob. 100 cmm Chlorella. v = 15,764 ccm; v_F = 7,00 ccm 20^0. „Hell" bedeutet, daß grünes Licht der Intensität $\mathfrak{J}$ = 28,6 cmm Quanten pro Minute eingestrahlt und 0,9 × 28,6 cmm Quanten absorbiert wurden. pH = 3,8. Versuch vom 26. 7. 1955.

her belichtet, so stieg nunmehr der Druck in den 5 Hellminuten um 9,5 mm; und bei Verdunkelung erschien eine Atmung, die $2^1/_2$-mal so groß war wie die Atmung vor der Belichtung.

Derartige Versuche bestätigten die paradoxen Erfahrungen von PRINGSHEIM[3] und von WILLSTAETTER[4] und STOLL, daß bei der Photosynthese O_2 vorhanden sein muß, damit O_2 entwickelt werden kann. Darüber hinaus lehren sie, warum dies so ist und wieviel O_2 vorhanden sein muß. Nach unseren Gleichungen müssen mindestens $^2/_3$ der O_2-Kapazität vorhanden sein, also zum Beispiel etwa 20 cmm, wenn ein Manometriegefäß, wie üblich, 100 cmm Chlorella enthält. Es sind also durchaus nicht „Spuren" von O_2, die nötig sind, sondern Mengen, die zu den angewandten Zellmengen in einem stöchiometrischen Verhältnis stehen. Deshalb ist es bei derartigen Versuchen nicht notwendig, den O_2 mit chemischen Mitteln wie Phosphor zu entfernen, gegen die man einwenden könnte, daß sie giftige Nebenwirkungen ausüben.

Es ist kaum notwendig zu erwähnen, daß die O_2-Kapazität der Chlorella nicht wie die O_2-Kapazität der roten Blutzellen durch Erniedrigung des O_2-Drucks ausgetrieben werden kann. Es ist aber möglich, daß die O_2-Kapazität der Chlorella durch ihre eigene normale Atmung verbraucht werden kann.

2. Phenanthrolin

Phenanthrolin[5] hemmt in sehr kleinen Konzentrationen die Photosynthese, woraus hervorgeht, daß an der Photosynthese ein dissoziierbares Schwermetall beteiligt ist. Phenanthrolin hemmt *nicht* die Atmung der Chlorella, *auch nicht* ihre induzierte Atmung, wie man zeigen kann, indem man in einem Manometriegefäß mit Birne, die O_2-Kapazität durch Licht austreibt, dann aus der Birne Phenanthrolin einkippt und anschließend verdunkelt. Dann erscheint die induzierte Atmung wie in der Kontrolle, zu der kein Phenanthrolin zugegeben worden ist. Läßt man andererseits — ohne Phenanthrolin — im Dunkeln die O_2-Kapazität entstehen, fügt dann Phenanthrolin hinzu und belichtet, so erhält man keine positiven Drucke. Phenanthrolin vernichtet also entweder eine vorhandene Kapazität, oder es verhindert die photochemische Austreibung der Kapazität.

Ein Versuchsbeispiel ist in Abb. 2 graphisch dargestellt, in der die beobachteten Druckänderungen als Funktion der Dunkel- und Hellzeiten eingezeichnet sind. Zunächst wurde die O_2-Kapazität der Chlorella — ohne Phenanthrolin — durch Licht entwickelt. Dann wurde wieder verdunkelt. War die induzierte Atmung abgeklungen, so wurde Phenanthrolin bis $^1/_{100}$-*m.* zugesetzt und wieder belichtet. Nunmehr trat im Licht keine wesentliche Druckänderung auf, sondern der von der Atmung herrührende negative Druck ging fast unverändert im Licht weiter und blieb auch bei Verdunkelung unverändert.

Bekanntlich wird von James Franck und seinem Anhang bestritten, daß eine O_2-Kapazität und eine induzierte Atmung der Chlorella existiert, mit der Begründung, die beobachteten manometrischen Effekte rührten von Erwärmung und Abkühlung her. Nichts könnte diese unwissenschaftliche Behauptungen besser widerlegen als die Versuche der Abb. 1 und 2, bei denen trotz Belichtung und Verdunkelung keine Druckänderungen auftreten, wenn man den Ablauf chemischer Reaktionen in der Chlorella hemmt.

3. Chlorophyll

Wie in der Einleitung erwähnt, ist das Verhältnis

$$\frac{O_2\text{-Kapazität}}{\text{Chlorophyllgehalt}}$$

bei nicht zu hohen Chlorophyllgehalten nahezu gleich eins. Es ist daraus zu schließen, daß der Träger des photodissoziierbaren O_2 stöchiometrisch mit dem Chlorophyll verbunden ist. Dann ist die Entwicklung des O_2 bei der Photosynthese nichts anderes als die Photodissoziation eines Pigments, vergleichbar der Photodissoziation des Kohlenoxyd-Häms

$$FeCO + 1\,h\nu = Fe + CO,$$

und es verschwindet aus der Photosynthese die unklare „Photosensibilisierung", durch die bisher das Chlorophyll-Molekül die absorbierte Lichtenergie auf andere Moleküle übertragen sollte.

Energieübertragung *innerhalb* eines Moleküls dagegen ist in der Biophysik eine wohlbekannte und quantitativ untersuchte Erscheinung, seit die Proteinbande der

Kohlenoxyd-Eisenoxygenase durch ihr ultraviolettes Wirkungsspektrum entdeckt worden ist[6].

Die Einführung des Chlorophylls in unsere Gleichungen hat den weiteren Vorteil, daß wir sofort verstehen, warum und in welchem Maße die photochemische Ausbeute im Verlauf der Austreibung der O_2-Kapazität abnimmt[1]. Denn nunmehr gibt es zwei Arten von lichtabsorbierenden Molekülen, Chlorophyllmoleküle, die mit photodissoziierbarem O_2 verbunden sind, und Chlorophyllmoleküle, die nicht mit O_2 verbunden sind. Nur Licht, das von den mit O_2 verbundenen Chlorophyllmolekülen absorbiert wird, kann photochemisch wirksam sein; während der andere Teil des Lichts photochemisch verlorengeht — genau wie bei der Photodissoziation des Kohlenoxyd-Häms.

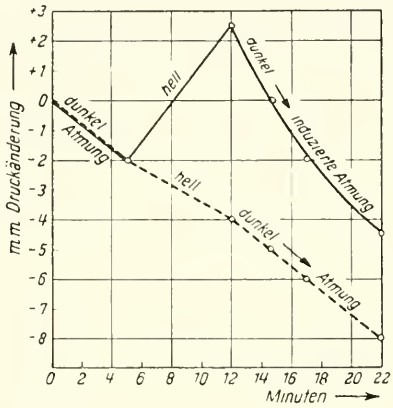


Abb. 2. Beobachtete Druckänderungen in mm Brodie. ———— ohne Phenanthrolin, - - - - - - $m/100$-Phenanthrolin. 100 cmm Chlorella. v = 15,764 ccm, v_F = 7,00 ccm. 20^0. „Hell" bedeutet, daß grünes Licht der Intensität $\mathcal{J}$ = 17,4 cmm Quanten pro Minute eingestrahlt und 0,88 · 17,4 cmm Quanten absorbiert wurden. pH = 3,88. Gasraum 10 Vol.-Proz. CO_2, 30 Vol.-Proz. O_2, 60 Vol.-Proz. Argon. Versuch vom 15. 7. 1955.

Mathematisch ist dieses Ergebnis folgendermaßen zu formulieren:

Es sei:

K = O_2-Kapazität = Chlorophyllgehalt (cmm),
x = nach t Min. ausgetriebene Kapazität = *nicht* mit O_2 verbundenes Chlorophyll (cmm),
$K-x$ = nach t Min. vorhandene Restkapazität = mit O_2 verbundenes Chlorophyll,
$\mathcal{J}$ = eingestrahlte Intensität (cmm Quanten pro Minute),
a = Bruchteil von $\mathcal{J}$, der *insgesamt* absorbiert wird,
$a \cdot \frac{K-x}{K}$ = Bruchteil von $\mathcal{J}$, der zur Zeit t von dem mit O_2 verbundenen Chlorophyll absorbiert wird.

$$\frac{1}{\varphi} = \text{Quantenbedarf der } O_2\text{-Entwicklung } \left(\frac{\text{cmm Quanten}}{\text{cmm } O_2}\right).$$

Dann beträgt die in der kleinen Zeit dt absorbierte Lichtmenge

$$\mathcal{J} \cdot a \, dt \quad \text{cmm Quanten},$$

und es beträgt die in der kleinen Zeit dt entwickelte O_2-Menge

$$\mathcal{J} \cdot a \cdot \frac{K-x}{K} \cdot dt \quad \text{cmm } O_2,$$

also

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{\mathcal{J} \cdot a \cdot dt}{\mathcal{J} \cdot a \cdot \frac{K-x}{K} \cdot dt} = \frac{K}{K-x}$$

und im besonderen

$$\frac{1}{\varphi} = 1 \text{ für } x = 0, \qquad \frac{1}{\varphi} = 2 \text{ für } x = \frac{K}{2},$$

$$\frac{1}{\varphi} = \infty \text{ für } x = K.$$

Anmerkung. Wenn die photodissoziierende O_2-Verbindung stöchiometrisch mit dem Chlorophyll verbunden ist, so könnte es sein, daß sich die Lichtabsorption der Chlorella ändert, wenn die O_2-Kapazität ausgetrieben wird. Zur Prüfung dieser Frage wurde eine Chlorellasuspension in die Ulbrichtsche Kugel gebracht. Ein auf $^1/_{100}$ schwächendes Neutralglas wurde entweder in den Weg des einfallenden Strahls gebracht oder an die Peripherie der Kugel, vor den Detector. In beiden Fällen wurde die Durchlässigkeit der Zellsuspension gemessen, in die also im ersten Fall sehr schwaches Licht eingestrahlt wurde, das die O_2-Kapazität nicht änderte, und in die im zweiten Fall sehr starkes Licht eingestrahlt wurde, das die Kapazität fast vollständig austrieb. In keinem Spektralbezirk wurden Unterschiede in der Lichtabsorption gefunden. Änderungen der Lichtabsorption bei der Austreibung der Kapazität, falls sie vorhanden waren, waren also klein. Doch sind hier keine größeren Änderungen zu erwarten als etwa bei der Allomersierung des Chlorophylls, Änderungen, die nach CONANT[1] im Sichtbaren sehr geringfügig sind.

Literatur

1 WARBURG, O., KRIPPAHL, G., SCHRÖDER, W., und BUCHHOLZ, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 769.

2 CONANT, J. B., Science (New York) 73 (1931), 268.

2a FISCHER, H., Chemie des Pyrrols, II, 2. S. 25. Akad. Verlags-Ges., Leipzig 1940.

3 PRINGSHEIM, N., Sitzungsber. d. Preuß. Akademie der Wissenschaften, 1887, S. 763.

4 WILLSTAETTER, R., und STOLL, A., Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Springer, Berlin 1918, S. 344.

5 WARBURG, O., Schwermetalle, Berlin 1948, und Heavy Metals, Oxford Clarendon Press 1949; Angew. Chem. 66 (1954), 493.

6 WARBURG, O., Biochem. Z. 214 (1929), 64; 255 (1932) 247 sowie Schwermetalle, Berlin 1948, und Heavy Metals, Oxford Clarendon Press, 1949.

7 CONANT, J. B., Amer. chem. Soc. 53 (1931), 2382.

31a Über den chemischen Mechanismus der Kohlensäureassimilation*

Von Otto Warburg, Günter Krippahl und Walter Schröder, Berlin-Dahlem

Nach einem am 25. 4. 1956 im Chemischen Institut der Humboldt-Universität in Berlin gehaltenen Vortrag.

Nach Arbeiten von Ochoa, Calvin[1], Horecker und Racker neigt man heute vielfach zu der Ansicht, daß in den belichteten grünen Pflanzenzellen zunächst Wasser in Sauerstoff und Wasserstoff gespalten wird in einer Reaktion, die als „Hill-Reaktion" bezeichnet wird. Der Sauerstoff des Wassers soll dabei frei werden, der Wasserstoff aber soll das Nikotinsäureamid hydrieren, die Wirkungsgruppe der wasserstoffübertragenden Atmungsfermente. Alles weitere soll dann durch einen Mechanismus erfolgen, der nicht viel anders ist als der in entgegengesetzter Richtung verlaufende Atmungsmechanismus.

Diese Theorie hat mehrere schwache Punkte. Erstens macht sie nicht den Versuch, zu erklären, was die Hill-Reaktion[2] ist, die doch in dem Gebäude die Hauptsache ist. Zweitens gibt es keine Versuche, die beweisen, daß die Sekundärreaktionen wirklich die Umkehr von Atmungsreaktionen sind. Zwar ist es wahr, daß bald nach der Belichtung Zwischenprodukte der Atmung auftreten, z. B. phosphorylierte Pentose und phosphorylierte Glycerinsäure. Aber da man heute weiß, daß der im Licht aus Kohlensäure entstehende Kohlenstoff in der induzierten Atmung sofort zu $^2/_3$ wieder zurückreagiert, so können die gefundenen Zwischenprodukte der Atmung ebensogut von der induzierten Atmung wie von einer Reduktion der Kohlensäure herrühren.

Wir beschreiben im folgenden Versuche, die in eine ganz andere Richtung weisen. Wir haben gefunden, daß die Kohlensäure zunächst von dem Chlorophyll chemisch gebunden wird, und daß dann die gebundene Kohlensäure innerhalb der Chlorophyllmolekel im Licht unter Sauerstoffentwicklung zur Stufe des Kohlenhydrats reduziert wird. Die Hauptreaktion der Kohlensäureassimilation verläuft hiernach innerhalb der Chlorophyllmolekel, also innerhalb derjenigen Substanz, die das Licht absorbiert, wodurch viele Schwierigkeiten fortfallen, die man bisher durch Annahme von Sensibilisierungen, Radikalen und Lebensdauern ohne großen Erfolg zu überwinden versuchte. Nunmehr dagegen, wenn das Licht innerhalb der Substanz wirkt, von der es absorbiert wird, wird die Kohlensäureassimilation gewöhnliche Photochemie.

---

*Aus: Die Naturwissenschaften 43 (1956) 237.

Zusatz 1961. Dies ist die erste Arbeit, in der wir die allgemein herrschende Ansicht von der Photolyse des Wassers verließen und sie in unsern Gleichungen ersetzten durch die Photolyse der Kohlensäure. Es war die Zeit, direkt vor der Entdeckung der „Glutaminsäure in Chlorella" und 4 Jahre vor der endgültigen Entdeckung des Photolyten der Photosynthese.

1. Züchtung der Zellen

Alle unsere Versuche sind mit lebender Chlorella ausgeführt worden, der Grünalge, die seit den Dahlemer Arbeiten von 1919 das Hauptversuchsobjekt der Kohlensäureassimilation geworden ist. Die Alge wird in rein anorganischem Medium, unter Zusatz der Arnonschen Mikroelemente[3] zu denen auch das Vanadium gehört, im Licht von Metallfadenlampen gezüchtet, wozu früher noch wechselnde Mengen Tageslicht kamen.

Bezüglich der Züchtung der Chlorella haben wir in der letzten Zeit einen wesentlichen Fortschritt erzielt. Schon lange wußten wir, daß Zellen, die das Licht gut ausnutzen, immer dann entstehen, wenn die Zellen bei der Zucht außer dem Metallfadenlicht auch Tageslicht erhalten. Die besten Zellen erhielten wir im Sommer bei schönem Wetter an einem Südfenster.

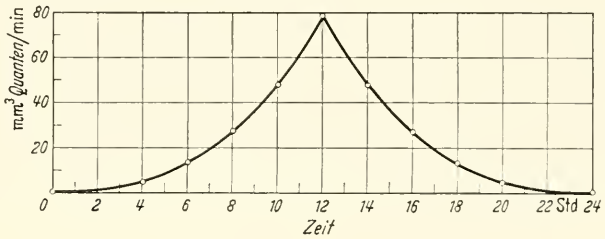


Fig. 1. Änderung der Quantenintensität in 24 Stunden, bei der Züchtung der Chlorella gemessen mit dem Chlorophyll-Quantenaktinometer

Wir haben nunmehr gefunden, daß es nicht, wie wir anfangs glaubten, die spektrale Zusammensetzung des Tageslichts ist, die hier günstig wirkt, sondern daß es die periodische Änderung der Intensität des Lichts ist. Züchten wir in einem gegen Tageslicht verdunkelten Raum mit einer 300-W-Metallfadenlampe, die konstant mit ihrer Normalspannung von 220 V brennt, so erhalten wir Zellen, die das Licht schlecht ausnutzen. Lassen wir aber die Betriebsspannung der gleichen Lampe in 24 Stunden von 50 bis 220 V ansteigen und wieder auf 50 V abfallen, so erhalten wir Zellen, die das Licht so gut ausnutzen wie die Tageslichtzellen an schönen Sommertagen.

Bei diesen Züchtungsversuchen mit fluktuierender Lampenspannung haben wir die Quantenintensitäten zu verschiedenen Zeiten der 24-Stunden-Periode mit unserem Quantenaktinometer gemessen — das nur Licht, das von Chlorophyll absorbiert wird, mißt — und haben eine Intensitätskurve erhalten, die in Fig. 1 abgebildet ist.

Der Unterschied zwischen den Zellen, die mit konstanter und mit fluktuierender Lichtintensität gezüchtet worden sind, ist sehr erheblich. Bei der Zucht mit *fluktuierender* Intensität erhalten wir Zellen, deren Quantenbedarf pro Molekel entwickelten Sauerstoffs, ohne Berücksichtigung der Atmung, 3,5 bis 4,5 ist und mit Berücksichtigung der Atmung 3,0 bis 4,0. Ein Quantenbedarf 3 bedeutet, daß die Lichtenergie im Rot bis zu 89% ausgenutzt wird.*

* *Zusatz 1961.* Somit sind nunmehr seit 1950 drei bisher unbekannte Bedingungen guter Quantenausbeuten gefunden worden: der CO_2-Druck, der bei den Messungen mindestens 200 mm Brodie betragen muß (während Emerson die Ausbeute bei 20 mm Brodie gemessen hat); die Notwendigkeit eines Zusatzes von blaugrünem Licht bei der Messung; und der Wechsel von Tag und Nacht bei der Kultur mit künstlichem Licht.

Bei der Zucht mit *konstanter* Lichtintensität erhalten wir Zellen, deren Quantenbedarf pro Molekel entwickelten Sauerstoffs 8 bis 12 ist. Da 8 bis 12 diejenigen Quantenzahlen sind, die JAMES FRANCK und seine Kollegen seit 30 Jahren finden und als die besten Ausbeuten betrachten, und da in Amerika mit konstanter Lichtintensität gezüchtet wird, so ist nunmehr die Ursache dieser großen Diskrepanzen aufgeklärt. Denn reproduzierbar, für aliquote Teile derselben Stammkultur, können wir die Franckschen Ausbeuten oder 2- bis 3mal bessere Ausbeuten erzeugen, je nachdem wir mit konstanter oder fluktuierender Lichtintensität züchten. Zur Erklärung möchten wir glauben, daß sich die Zellen gegen die ununterbrochene Belichtung, die unnatürlich ist, dadurch zur Wehr setzen, daß sie den größeren Teil ihres Chlorophylls inaktivieren, das dann Licht absorbiert, aber keine Kohlensäure reduziert.

2. Die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung[1]

Wir beschreiben nunmehr denjenigen Versuch, der den größten Fortschritt auf unserem Gebiet bedeutet, die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung aus Chlorella. Mit „stöchiometrisch" meinen wir, daß mit einer gegebenen Menge Chlorella nicht

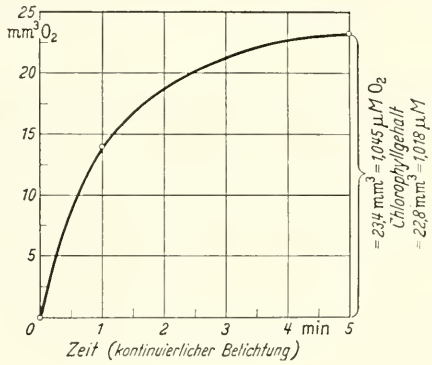


Fig. 2. Stöchiometrische Sauerstoffentwicklung aus Chlorella im Licht, bei Einstrahlung konstanter Lichtintensität

beliebig viel Sauerstoff im Licht entwickelt werden kann, wie bei den Versuchen bei denen die Chlorella Katalysator ist, sondern daß nur eine begrenzte Menge Sauerstoff entwickelt werden kann, die abhängt von der Menge der Chlorella.

Um von der katalytischen zur stöchiometrischen Anordnung zu gelangen, muß man die Chlorella aus ihrem normalen Kulturmedium in ein modifiziertes Salzmedium übertragen, das aber den Zellen nicht schadet, da sie bei Rückführung in ihr normales Medium unverändert weiterwächst.

In Fig. 2 ist ein Versuch graphisch dargestellt, bei dem 100 mm³ Chlorella, suspendiert in dem modifizierten Medium, mit konstanter Lichtintensität belichtet wurden und bei dem der entwickelte Sauerstoff gemessen wurde. Die Zeit t_0 ist dabei der Beginn der Belichtung nach Dunkelheit. Wie man sieht, wird die zuerst schnelle Sauerstoffentwicklung bald langsamer und schließlich fast Null. Dann ist der Endwert an entwickeltem Sauerstoff erreicht, der in unserem Versuch 23,4 mm³ Sauerstoff beträgt. Aus 100 mm³ Zellen kann also Licht 23,4 mm³ = 1,05 Mikromole Sauerstoff entwickeln, das ist etwa so viel Sauerstoff, als rote Blutzellen

gebunden an Hämoglobin enthalten. Die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung ist also sehr erheblich.

War bei dem Versuch die Sauerstoffentwicklung beendet und abgelesen, so wurden die Zellen aus dem Versuchsgefäß herausgenommen, und es wurde ihr Chlorophyllgehalt bestimmt, der gleich 1,02 Mikromolen gefunden wurde. Der Endwert an entwickeltem Sauerstoff war also, in Molen ausgedrückt, gleich dem Chlorophyllgehalt.

Diese Beziehung hat sich als allgemein gültig erwiesen bis zu Chlorophyllgehalten von 5% des Zelltrockengewichts. Wurde der Chlorophyllgehalt der Zellen von 1 auf $^1/_2$ oder auf $^1/_7$ vermindert — was man durch Erhöhung der Lichtstärke bei der Züchtung der Zellen in 24 Stunden erreichen kann —, so wurden Endwerte an entwickeltem Sauerstoff gefunden, die im Verhältnis $1:^1/_2:^1/_7$ standen. Man muß daraus schließen, daß der Sauerstoff aus einer Substanz entwickelt wird, von der 1 Molekel mit 1 Molekel Chlorophyll verbunden ist. Ich will, zunächst ohne Beweis, vorwegnehmen, daß diese Substanz Kohlensäure* ist, so daß wir also die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung schreiben können:

$$\text{Hell:}\quad (\mathrm{ChlCO_2}) + \mathrm{H_2O} = \mathrm{Chl} + \mathrm{CH_2O} + \mathrm{O_2}.$$

wo Chl Chlorophyll bedeutet und CH_2O allgemein die Stufe, bis zu der die Kohlensäure reduziert worden ist.

3. Quantenbedarf

Mißt man bei der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung außer dem Sauerstoff und dem Chlorophyll noch eine dritte Größe, nämlich das absorbierte Licht, so erhält man den Quantenbedarf der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung. Es hat sich ergeben, daß zu Beginn der Belichtung 1 Lichtquantum 1 Molekel Sauerstoff entwickelt; daß die Quantenausbeute auf die Hälfte gesunken ist, wenn die Hälfte des Sauerstoffs entwickelt worden ist, auf $^1/_4$, wenn $^3/_4$ des Sauerstoffs entwickelt worden ist, oder allgemein, daß für den ganzen Verlauf der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung die Gleichung gilt

$$q = \frac{\mathrm{O_2}}{h\nu} = 1 \cdot \frac{E - x}{E} \left\{ \begin{array}{ll} x = 0 & q = 1 \\ x = E & q = 0 \end{array} \right.,$$

wo E den Endwert an ausgetriebenem Sauerstoff bedeutet und x den bereits ausgetriebenen Sauerstoff.

Diese einfache Gleichung bedeutet, daß nur dasjenige Licht wirksam ist, das von dem mit CO_2 verbundenen Chlorophyll absorbiert wird, während das von dem freien Chlorophyll absorbierte Licht für die Wirkung verlorengeht. Setzt man nur dasjenige Licht in die Rechnung ein, das von dem verbundenen Chlorophyll absorbiert wird, so ist die Quantenausbeute für den ganzen Verlauf der Sauerstoffentwicklung gleich 1:

$$(\mathrm{ChlCO_2}) + \mathrm{H_2O} + 1\,h\nu = \mathrm{Chl} + \mathrm{CH_2O} + \mathrm{O_2}, \qquad [1]^{**}$$

* *Zusatz 1961.* Statt Kohlensäure muß es heißen „ein Kohlensäurederivat" ist.

** *Zusatz 1961.* Alles, was seitdem gefunden worden ist, hat diese Gleichung bestätigt.

wo $h \cdot \nu$ also nur die von dem verbundenen Chlorophyll absorbierten Quanten bedeuten.

Ganz entsprechende Gleichungen haben wir früher für andere photochemische Pigmentreaktionen gefunden, z. B. für die Photodissoziation der Kohlenoxydeisenverbindungen

$$FeCO + 1\,h\nu = Fe + CO.$$

Es sind die Gleichungen der Photodissoziation von Pigmenten für den Fall, daß das freie und das verbundene Pigment gleich stark absorbieren. Die Gültigkeit der Gl. [1] ist also ein weiterer Beweis dafür, daß bei der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung der Sauerstoff aus dem Chlorophyll entwickelt wird.

In der allgemeinen Photochemie gilt ein Problem dann als gelöst, wenn man die Reaktion gefunden hat, deren Quantenausbeute 1 ist, während ein Mehrquantenbedarf, den man findet, immer bedeutet, daß Sekundär- oder Rückreaktionen die Primärreaktion verdecken. So ist nunmehr gefunden, daß die 1-Quanten-Reaktion der Kohlensäureassimilation die Sauerstoffentwicklung aus einer CO_2-Chlorophyllverbindung ist, und wenn wir bei nichtstöchiometrischen Versuchen einen Quantenbedarf von drei oder mehr pro Molekel Sauerstoff finden, so kann es nicht anders sein, als daß Sekundärreaktionen hinzukommen, die das einfache Verhältnis 1 O_2:1 Quantum verdecken.

4. Rückreaktion

Eine solche Sekundärreaktion sieht man, wenn man bei der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung, nachdem der Endwert erreicht ist, verdunkelt. Dann sieht man, wie $^2/_3$ des im Licht entwickelten Sauerstoffs zurückreagiert und dabei $^2/_3$ des im Licht erhaltenen Reduktionsprodukts der Kohlensäure verbrennt. Wenn nun 1 Mol Quanten 1 Mol Sauerstoff entwickeln, aber $^2/_3$ Mole Sauerstoff immer wieder zurückreagieren, so entwickelt in der Bilanz 1 Mol Quanten nur $^1/_3$ Mol Sauerstoff oder 3 Mole Quanten entwickeln ein *ganzes* Mol Sauerstoff. So kommt bei der nichtstöchiometrischen, bei der katalytischen Versuchsanordnung, durch Überlagerung von Lichtreaktion und Rückreaktion der Mehrquantenbedarf pro Molekel Sauerstoff zustande, den man bei der katalytischen Versuchsanordnung immer gefunden hat und den man aus energetischen Gründen auch finden mußte. Doch wollen wir hier, wo wir auf den chemischen Mechanismus der CO_2-Assimilation hinaus wollen, die Energie beiseite lassen.

Historisch ist zu dem Bisherigen zu bemerken, daß die Quantenausbeute 1 bei der Entwicklung des Sauerstoffs bereits 1950 in Dahlem von Dean Burk und dem Verfasser (O. W.) gefunden worden ist[5], daß aber diese Entdeckung damals nicht die ihr zukommende Beachtung fand, da James Franck und eine Schar von Kollegen die Versuche, statt sie zu wiederholen oder in Dahlem anzusehen, aus theoretischen Gründen für unmöglich erklärten. Inzwischen sind die Methoden zur Messung der Quantenausbeute 1 wesentlich verbessert worden; die überlagernde Rückreaktion ist zeitlich weiter hinausgeschoben worden, und es ist eine zweite unabhängige chemische Methode zur Messung ausgearbeitet worden. Die Quantenausbeute 1 bei der Entwicklung des O_2 ist heute so sicher und so genau zu bestimmen wie etwa die Sauerstoffkapazität des Blutes, und wenn jemand sie noch

heute nicht finden sollte, so ist mit Bestimmtheit zu sagen, daß er noch immer die alten Zellen in Händen hat, deren Quantenbedarf bei der katalytischen Anordnung 12 ist und also bei der stöchiometrischen Anordnung nicht 1, sondern bestenfalls $^{12}/_{3} = 4$ sein kann.

5. Kohlensäure[6]

Betrachten wir unsere Gleichung der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung, so wird nach ihr der Sauerstoff aus Kohlensäure entwickelt, und zwar aus Kohlensäure, die mit dem Chlorophyll verbunden ist. Wir wollen nunmehr Experimente

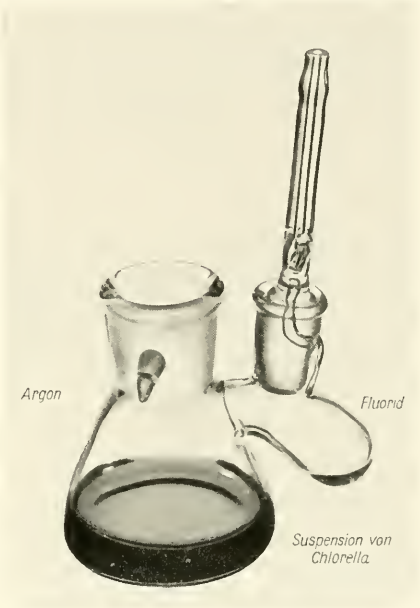


Fig. 3.
Manometriegefäß zur Messung der stöchiometrischen Kohlensäureentwicklung

beschreiben, aus denen hervorgeht, daß die im Chlorophyll gebundene Kohlensäure tatsächlich die Quelle des entwickelten Sauerstoffs ist.

Hat man bei der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung im Licht den Sauerstoffendwert erreicht, so muß man eine Dunkelpause einlegen, wenn man weitere Mengen Sauerstoff entwickeln will. In dieser Erholungszeit, die bei unserer Versuchsanordnung 20 min beträgt, muß Sauerstoff zugegen sein, da sonst die induzierte Atmung nicht ablaufen kann, die ja energetisch erst ermöglicht, daß der Sauerstoff im Licht entwickelt wird.

Wir haben nunmehr gefunden, daß in der Erholungszeit nicht nur Sauerstoff zur Verfügung stehen muß, sondern auch Kohlensäure. Tatsächlich erhält man, wenn in der Erholungszeit Sauerstoff *und* Kohlensäure zur Verfügung stehen, beim Einsetzen der Belichtung wieder den vollen Sauerstoffwert, d. h. 1 Molekel Sauerstoff pro Molekel Chlorophyll. Steht aber nur Sauerstoff und keine Kohlensäure zur Verfügung, so erhält man bei Belichtung keinen Sauerstoff.

Über dieses Ergebnis haben wir uns sehr gewundert. Zwar ist die Notwendigkeit der Kohlensäure bei der *katalytischen* Sauerstoffentwicklung selbstverständlich,

da es ja in der Bilanz die Kohlensäure ist, die reduziert wird. Aber daß bei der *stöchiometrischen* Sauerstoffentwicklung eine vorherige Bindung der Kohlensäure Vorbedingung ist, schien uns unvereinbar zu sein mit der herrschenden Auffassung, daß die Primärreaktion der Kohlensäureassimilation die Wasserzersetzung ist. Die folgenden Versuche über die stöchiometrische Kohlensäureentwicklung haben hier die unwiderlegliche Entscheidung erbracht.

6. Die stöchiometrische Kohlensäureentwicklung[7]*

Ein Manometriegefäß (Fig. 3) enthält im Hauptraum 3 cm^3 Chlorellasuspension, in der Ansatzbirne 0,2 cm^3 $n/10$ Natriumfluorid, im Gasraum reines, CO_2-freies Argon. pH im Hauptraum und in der Birne ist 3,8. Gibt man dann — im Dunkeln — das Fluorid in den Hauptraum, so wird — im Dunkeln — Kohlensäure aus der

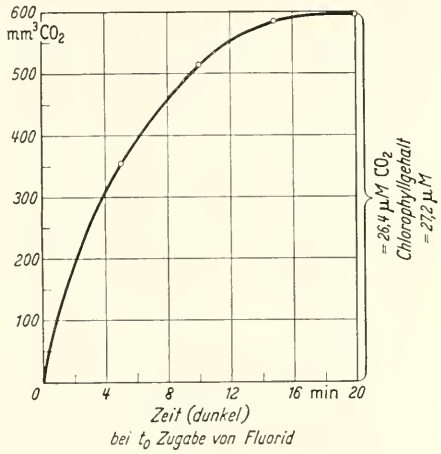


Fig. 4.
Stöchiometrische Kohlensäureentwicklung aus Chlorella im Dunkeln

Chlorella bis zu einem Endwert ausgetrieben, der in etwa 20 min erreicht ist (Fig. 4). Zum Beispiel wurden aus 1500 mm^3 Chlorella in 20 min 592 mm^3 CO_2 ausgetrieben, das sind 26,4 Mikromole. Wurde dann der Chlorophyllgehalt bestimmt, so wurden in den 1500 mm^3 Zellen 27,2 Mikromole Chlorophyll gefunden. Wiederum also, wie bei der Entwicklung des Sauerstoffs im Licht, aber diesmal bei einer Dunkelreaktion, stoßen wir auf eine stöchiometrische Beziehung zum Chlorophyll: Die Menge der durch Fluorid austreibbaren Kohlensäure ist gleich dem Chlorophyllgehalt der Zellen. Wiederum haben wir — durch Züchtung bei verschiedenen Lichtstärken — den Chlorophyllgehalt der Zellen im Verhältnis $1 : 1/2 : 1/7$ variiert; im gleichen Verhältnis fanden wir dann die Endwerte der ausgetriebenen Kohlensäure. Wir müssen daraus schließen, daß die durch Fluorid austreibbare Kohlensäure an das Chlorophyll der Chlorella gebunden ist.

Erhitzt man die Zellen vorher 5 min auf 65°, so kann nachher durch Fluorid keine Kohlensäure ausgetrieben werden. Gefriert man die Zellen vorher und trock-

* *Zusatz 1961.* Damals war die Glutaminsäure als Quelle dieser Kohlensäure noch nicht entdeckt, auch nicht der Photolyt, das heißt die mit der Glutaminsäure verbundene und mit Hilfe von Phosphatenergie umgewandelte Kohlensäure.

net sie dann im gefrorenen Zustand, so kann nachher mit Fluorid keine Kohlensäure ausgetrieben werden. Sehr kleine Konzentrationen an Blausäure, z. B. 10^{-4} normal, verhindern die Austreibung der Kohlensäure durch Fluorid. Aus alledem folgt, daß die Austreibung der Kohlensäure durch Fluorid eine Fermentreaktion ist.

Treibt man die Kohlensäure durch Fluorid aus, wäscht dann das Fluorid aus den Zellen heraus und sättigt die Zellen mit einem Gasgemisch, das Kohlensäure enthält, so wird die vorher durch Fluorid ausgetriebene Kohlensäure wieder gebunden, aber nur dann, wenn das Gasgemisch außer Kohlensäure auch Sauerstoff enthält. Mit anderen Worten, es ist Atmung zur Bindung der Kohlensäure notwendig, oder mit noch anderen Worten, es ist Energie zur Bindung der Kohlensäure nötig. Die Bindung der Kohlensäure an das Chlorophyll ist also ein hochbiologischer Vorgang, und man wird hiernach vermuten, daß es diejenige Kohlensäure ist, aus der im Licht der Sauerstoff entwickelt wird. Durch die folgenden Versuche ist diese wahrscheinliche Vermutung bewiesen worden.

7. Funktion der Kohlensäure

Man teilt eine Zellsuspension in 3 Teile und treibt aus dem ersten Teil mit Fluorid alle Kohlensäure aus, also 1 Mol pro Mol Chlorophyll; aus dem zweiten Teil treibt man nur ein halbes Mol Kohlensäure aus, und aus dem dritten Teil treibt man gar keine Kohlensäure aus. Sättigt man die Zellen dann mit 10 Vol.-% Kohlensäure in Luft und belichtet, so findet man, daß im ersten Fall gar kein Sauerstoff entwickelt wird, im zweiten Fall $^1/_2$ Mol und im dritten Fall ein ganzes Mol Sauerstoff pro Mol Chlorophyll. Wäscht man aber aus dem ersten Teil das Fluorid wieder fort und bindet die Kohlensäure wieder an das Chlorophyll, so wird jetzt im Licht wieder 1 Mol Sauerstoff aus 1 Mol Chlorophyll entwickelt. Das Ergebnis ist also, daß nur die mit Fluorid austreibbare Kohlensäure bei Belichtung Sauerstoff entwickeln kann, während alle anderen Formen von Kohlensäure, die bei Sättigung mit 10 Vol.-% Kohlensäure in den Zellen vorhanden sind, die physikalisch gelöste Kohlensäure oder die Bikarbonatkohlensäure, für das Licht unangreifbar sind.

Und die umgekehrte Versuchsanordnung: Wir entwickeln zunächst im Licht aus dem Chlorophyll 1 Mol Sauerstoff und geben dann nach Verdunkelung Fluorid zu den belichteten Zellen und zu den nicht belichteten Kontrollzellen. Dann entwickelt Fluorid aus den belichteten Zellen weniger Kohlensäure als aus den nicht belichteten Kontrollzellen, wie es sein muß, wenn der entwickelte Sauerstoff aus der chemisch gebundenen Kohlensäure stammt.

8. Chlorophyll

Schreiben wir die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung und die stöchiometrische Kohlensäureentwicklung untereinander, so erhalten wir:

$$\begin{array}{ll} \text{Hell:} & ChlCO_2 = Chl + C + O_2 \\ \text{Dunkel:} & Chl + CO_2 = ChlCO_2 \\ \hline \text{Bilanz:} & CO_2 = C + O_2. \end{array}$$

Aus der Bilanz hebt sich das Chlorophyll heraus, das also hier ein durch chemische Zwischenreaktionen wirkender Katalysator ist. Ein Traum der Chemiker[8] ist so in

Erfüllung gegangen: daß das Chlorophyll nicht nur physikalisch durch Absorption des Lichts, sondern auch chemisch an der Assimilation der Kohlensäure beteiligt ist.

Die weitere Verfolgung dieser Entdeckung wird ergeben, *wo* in der Chlorophyllmolekel die funktionelle Kohlensäure gebunden ist. Schon jetzt ist es wahrscheinlich, daß die funktionelle Kohlensäure bei der Extraktion des Chlorophylls verlorengeht und deshalb in der Chlorophyllformel von HANS FISCHER nicht vorkommt. In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen werden unseres Erachtens die

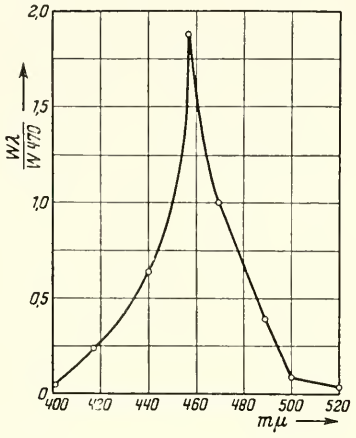


Fig. 5. Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts

Chlorophyllarbeiten von JAMES CONANT[9] aus dem Jahre 1931 wichtig werden, seine Entdeckung der Autoxydation des Chlorophylls und der labilen Kohlensäure des Chlorophylls.

Auch die katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts[10] mag dabei eine Rolle spielen. Im Maximum des blaugrünen Wirkungsspektrums, das in Fig. 5 abgebildet ist, absorbieren nicht nur die Carotinoide, sondern hier hat auch das reine Chlorophyll b eine Bande.

9. Energetik

Während in unseren früheren Energiegleichungen[11], in Konzession an die herrschenden Ideen, die Kohlensäure nur Wasserstoffakzeptor war, die in einer Dunkelreaktion reduziert wurde, muß die Kohlensäure nunmehr ihren Platz in der Lichtreaktion erhalten. Dann entwickeln im Licht 3 Mole Lichtquanten 3 Mole Sauerstoff aus 3 Molen gebundener Kohlensäure

$$\text{Hell:}\quad 3[\text{ChlCO}_2] + 3\,N_0 \cdot h \cdot \nu = 3\,\text{Chl} + 3\,\text{C} + 3\,\text{O}_2. \qquad [1]$$

Zwei Mole Sauerstoff reagieren in der induzierten Atmung zurück

$$\text{Dunkel:}\quad 2\,\text{C} + 2\,\text{O}_2 = 2\,\text{CO}_2 + 2 \cdot 100\,000\ \text{cal} \qquad [2]$$

und liefern die Energie zur Bindung der Kohlensäure und Wiederherstellung des Ausgangszustandes

$$\text{Dunkel:}\ 3\,\text{Chl} + 3\,\text{CO}_2 = 3\,[\text{ChlCO}_2] - 2 \cdot 100\,000\ \text{cal}. \qquad [3]$$

Addiert man die drei Gleichungen, so erhält man die Bilanz

$$\text{Bilanz:}\quad 1\,CO_2 + 3\,N_0 \cdot h \cdot \nu = 1\,C + 1\,O_2 \qquad [4]$$

und damit im Rot den Energieumsatz

$$\varepsilon = \frac{112000}{3 \cdot N_0\, h \cdot \nu} \cdot 100 = \frac{112000}{3 \cdot 42000} \cdot 100 = \frac{112000}{126\,000} \cdot 100 = 89\%.$$

Die Energetik wird besonders einfach und anschaulich, wenn man annimmt,* daß die Bindung der Kohlensäure in [3] durch die Energie der induzierten Atmung eine reduktive Carboxylierung ist, also eine Reduktion der Kohlensäure zur Stufe der Ameisensäure. Die weitere Reduktion, zur Stufe des Kohlenhydrats, würde dann in der Lichtreaktion erfolgen, während der Sauerstoff aus *beiden* Reduktionsprozessen im Licht als molekularer Sauerstoff entwickelt würde. Ob man dabei die hydratisierten oder die nicht hydratisierten Säuren reagieren läßt, ist für das Ergebnis gleichgültig.

Erläuterungen

Aufnahme der Intensitätskurve für die Zell-Kulturen mit dem Quantenaktinometer

In ein Manometriekästchen von etwa 16 cm^3 Inhalt wurden 3 mg Chlorophyllid, 200 mg Thioharnstoff und 7 cm^3 destilliertes farbloses Pyridin gegeben. Im Gasraum war Luft. Es wurde dann im Thermostaten geschüttelt und mit einer 300-Watt-Lampe belichtet, die sich in 20 cm Entfernung vor dem Thermostaten befand. Dann wurde für Betriebsspannungen zwischen 50 und 220 V der Sauerstoffverbrauch pro Minute im Aktinometer gemessen. Da das Aktinometer nur Licht absorbiert, das von dem Chlorophyll absorbiert wird und da es nicht die Energie, sondern die Quantenzahlen mißt, so ist es hier besonders zweckdienlich und könnte durch kein anderes Instrument ersetzt werden.

Die stöchiometrische Sauerstoffentwicklung

haben wir zum Teil mit einer neuen chemischen Methode gemessen, bei der der im Licht entwickelte Sauerstoff mit $Na_2S_2O_4$ absorbiert wird; zum Teil mit der 2-Gefäßmethode. Wir haben mit beiden Methoden die gleichen Endwerte an Sauerstoff gefunden. Die 2-Gefäßmethode, die in den Händen von Emerson, Gaffron, Brown und Rabinowitsch falsche Resultate gegeben hat, ist damit durch eine unabhängige chemische Methode verifiziert worden. Übrigens haben wir nie eingesehen, warum die Druckmessung in *einem* Gefäß richtige Werte ergeben soll, während die Werte falsch werden sollen, wenn man ein *zweites* gleichartiges Gefäß im Thermostaten danebenhängt.

Die stöchiometrische Kohlensäureentwicklung

Hier ist die saure Reaktion (pH 3,8) von entscheidender Bedeutung, weil nur die undissoziierte Flußsäure in die lebende Chlorella eindringt. Man kann die Kohlensäure auch mit viel kleineren Mengen an Fluorid austreiben, als im Text angegeben ist; aber dann dauert die Austreibung länger. — Bei der Bestimmung der funktionellen Kohlensäure mit Fluorid sättigt man die Zellen vorher mit reinem, CO_2-freiem Argon, um die Atmung auszuschalten und um vom Druck der Kohlensäure abhängige andere Kohlensäureverbindungen zu beseitigen. — Sättigt man die Zellen mit 10 Vol.-% CO_2, 30% O_2, 60% Argon, so erhält man bei Zugabe von Fluorid außer der funktionellen Kohlensäure auch andere Kohlensäure, insgesamt statt 1 Mol pro Mol Chlorophyll etwa 1,8 Mole CO_2, aber nur 1 Mol davon ist mit 10^{-4} nHCN glatt hemmbar.

*Stöchiometrische Kohlensäureentwicklung im Licht**

Da, wie bereits im Text erwähnt, die katalytisch wenig wirksamen Zellen ebensoviel funktionelle Kohlensäure enthalten wie die katalytisch hochwirksamen Zellen, so kann es nicht die Bindung

* *Zusatz 1961.* Diese Absätze sind heute zu streichen.

der Kohlensäure sein, durch die sich die wenig wirksamen und die hochwirksamen Zellen unterscheiden, sondern es muß die Wirkung des Lichts auf die gebundene Kohlensäure sein. Tatsächlich entwickeln Zellen, die katalytisch 12 Quanten pro Mol Sauerstoff benötigen, bei der stöchiometrischen Anordnung nicht 1 Mol, sondern nur $^1/_4$ Mol Sauerstoff pro Mol Chlorophyll. Sie entwickeln aber neben dem $^1/_4$ Mol Sauerstoff außerdem $^3/_4$ Mole Kohlensäure im Licht. Addiert man also Sauerstoff- und Kohlensäureentwicklung (im Licht), so erhält man wieder 1 Mol Gas pro Mol Chlorophyll. Dieses interessante quantitative Ergebnis zeigt, daß diejenige gebundene Kohlensäure, die aus irgendwelchen Mangelgründen im Licht keinen Sauerstoff entwickeln kann, durch Licht von dem Chlorophyll wieder abgespalten wird.

Züchtung der Zellen

Aussaat: 0,1 mm^3 Zellen pro cm^3 Kulturlösung. Ernte nach 24 Stunden: 3 mm^3 Zellen pro cm^3 Kulturlösung.

Literatur

1 Calvin, M., Z. angew. Chem. 68 (1956), 253.
2 Vgl. dazu O. Warburg und G. Krippahl [Z. Naturforsch. 10b (1955), 301], wo gezeigt wird, daß die Hill-Reaktion in lebender Chlorella durch eine CO_2-Katalyse zustande kommt.
3 Arnon, D., Nature (London) 172 (1953), 1039; und allgemein. Amer. J. Bot. 25 (1938), 322.
4 Warburg, O., und Schröder, W., Z. Naturforsch. 10b (1955), 639.
5 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforsch. 6b (1951), 12. O. Warburg, Z. Elektrochem. 55 (1951), 447.
6 Warburg, O., und Krippahl, Günter, Z. Naturforsch. 11b (1956), 52.
7 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforsch. 11b (1956), 179.
8 Willstätter, R., und Stoll, A., Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin: Springer 1918.
9 Conant, James, B., J. Amer. Chem. Soc. 53 (1931), 359, 1615, 2382, 3171.
10 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforsch. 9b (1954), 164, 667; 10b (1955), 631.
11 Warburg, O., Naturwiss. 42 (1955), 449.

31b Über die CO_2-Kapazität der Chlorella und den chemischen Mechanismus der CO_2-Assimilation*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Belichtet man vorher verdunkelte Chlorella, so wird pro Molekül Chlorophyll 1 Mol. O_2 ausgetrieben

$$(Chl)O_2 + 1\,h\nu = (Chl) + O_2,$$

wo $h\nu$ die Lichtquanten bedeuten, die von dem mit O_2 verbundenen Chlorophyll absorbiert werden, wie bei der Spaltung des Kohlenoxyd-Häms

$$FeCO + 1\,h\nu = Fe + CO.$$

Ist der photodissoziierbare O_2 ausgetrieben, so kann er im Dunkeln durch die Energie der induzierten Atmung wieder ersetzt werden. Verhindert man jedoch durch Entziehung des O_2 die induzierte Atmung, so bleibt die Erholung aus, und man erhält bei einer folgenden Belichtung keinen Sauerstoff[1].

Beim experimentellen Ausbau dieser Ergebnisse haben wir folgendes gefunden:

1. Zum Wiederaufbau der O_2-Kapazität im Dunkeln ist nicht nur O_2, sondern auch CO_2 notwendig, Entzieht man nach Austreibung der O_2-Kapazität im Licht der Chlorella die Kohlensäure, so wird trotz Anwesenheit von Sauerstoff im Dunkeln keine O_2-Kapazität nachgebildet. Zum Beispiel wurde nach einer Dunkelzeit von 20 Minuten bei Belichtung von 100 cmm Chlorella eine Entwicklung von 20 cmm oder von 0 cmm O_2 gefunden, je nachdem in der Dunkelzeit der CO_2-Druck $^1/_{10}$ Atmosphäre oder 0 betrug.

2. Gibt man Chinon im Dunkeln zu einer Suspension von Chlorella (in Kulturlösung), so wird Kohlensäure ausgetrieben, und zwar 1 Mol. pro Mol. Chlorophyll. Enthielten zum Beispiel 200 cmm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Lösung pH 3,9, 3,37 μMole Chlorophyll und wurden 2 mg Chinon zugegeben (Gasraum Argon), so wurden in 60 Minuten 69 cmm CO_2 (= 3,1 μMole) ausgetrieben. Diese Aus-

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 11b (1956): 52.

Zusatz 1961. Als wir fanden, daß Chlorella große Mengen Kohlensäure mit Hilfe der Atmung schnell chemisch binden kann und daß die gebundene Menge in geeignet gezüchteten Zellen nahezu dem Chlorophyll äquivalent ist, nahmen wir zunächst an, daß diese Kohlensäure von dem Kohlenstoffatom 10 des Chlorophylls gebunden werde. Wir haben diese Annahme bald zurückgenommen (vergl. die folgende Arbeit), weil Gewitz und Völker feststellten, daß der Gehalt des Chlorophylls an Chlorin während der Bindung der Kohlensäure konstant bleibt; und daß die Glutaminsäure die Quelle der Kohlensäure ist. Trotzdem haben wir die Diskussion über das Kohlenstoffatom 10 in diese Sammlung aufgenommen, weil es noch unentschieden ist, ob das Kohlenstoffatom 10 des Chlorophylls nicht doch wenn auch in anderer Weise, funktionell im Mechanismus der Photosynthese ist; und weil die Bindung der Photolyten an das Chlorophyll sich bestätigt hat.

treibung wird durch 10^{-5}-*n*. HCN wesentlich und durch 10^{-4}-*n*. HCN vollständig gehemmt. Wir nennen die durch Chinon austreibbare CO_2 *die CO_2-Kapazität der Chlorella.*

3. Nach der Austreibung der CO_2-Kapazität aus Chlorella durch Chinon im Dunkeln ist die Wirkung des Lichts auf die CO_2 vollständig verschwunden, aber die Wirkung des Lichts auf das Chinon erhalten. Die ihrer CO_2 beraubte Chlorella verhält sich also im Licht wie die isolierten grünen Grana, oder, anders ausgedrückt: die chemisch gebundene CO_2 ist nicht an der Chinon-Reduktion beteiligt.

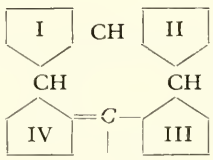
4. Aus isolierten Grana kann durch Chinon keine CO_2 ausgetrieben werden.

5. Noch schneller als durch Chinon wird die CO_2-Kapazität der Chlorella im Dunkeln durch Milchsäure ausgetrieben, wobei man am besten beim CO_2-Druck 0 arbeitet, um keine Bicarbonat-CO_2 in den Zellen zu haben. Auch diese Austreibung der CO_2 wird durch 10^{-5}-*n*. HCN wesentlich und durch 10^{-4}-*n*. HCN vollständig gehemmt. Zum Beispiel gaben wir 0,2 ccm 2-*n*. Milchsäure zu 200 ccm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Kulturlösung (Gasraum Argon), und erhielten dann (bei pH 2,7) in 20 Minuten, nachdem der Endwert erreicht war, 3,16 Mole CO_2, während die 200 cmm Zellen 3,37 μMole Chlorophyll enthielten. 1-*n*. H_2SO_4 jedoch, die das Magnesium abspaltet, treibt keine CO_2 aus, da sie die Fermente zerstört.

6. Erhitzt man eine Chlorella-Suspension 7 Minuten auf 63^0, wobei die Suspension ihr Aussehen nicht ändert, und gibt dann zu dieser erhitzten Suspension Chinon oder Milchsäure, so wird *keine* CO_2 ausgetrieben. Es folgt daraus, ebenso wie aus der Antikatalyse der Blausäure, daß an der Austreibung der CO_2-Kapazität Fermentreaktionen beteiligt sind.

7. Chlorophyll, in Alkohol gelöst, absorbiert in alkalischer Lösung, wie CONANT 1931 fand[2], 1 Mol. Sauerstoff. Wir fanden, daß das in Chlorella gebundene Chlorophyll, in wäßriger Suspension, sich entsprechend verhält. Suspendiert man 200 cmm Chlorella in 3 ccm Wasser, erhitzt die Suspension 7 Minuten auf 63^0 und gibt (Gasraum Luft) bei 20^0 50 mg LiOH hinzu, so wird im Verlauf von 40 Minuten 1 Mol. O_2 pro Mol. Chlorophyll absorbiert. Man kann also die „Conantzahl" des Chlorophylls der Chlorella bestimmen, ohne das Chlorophyll zu isolieren.

Aus unseren Experimenten schließen wir, daß die CO_2-Assimilation auf chemischen Zwischenreaktionen des Chlorophylls beruht. Von der Chlorophyllformel interessiert dabei nur der halbfett gedruckte Teil, das ist ein Teil des geöffneten isocyclischen Rings FISCHERS, den CONANT[2] bereits 1931 in der hier benutzten Form geschrieben hat.

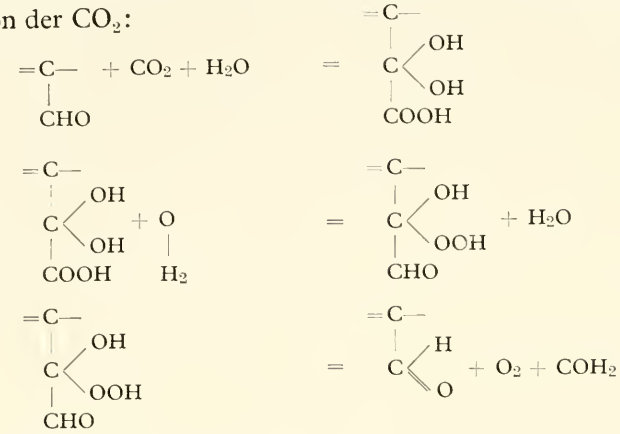


[10] *CHOH*

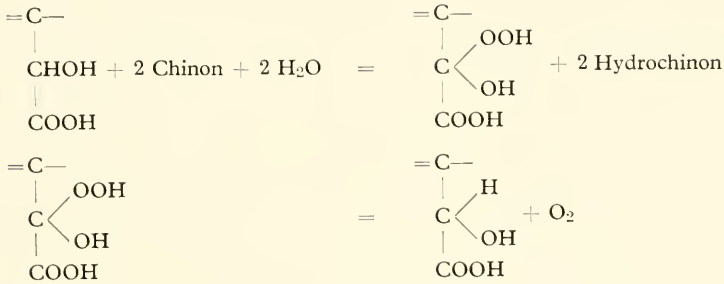
[11] *COOH*

An diesem Teil des Chlorophylls sollen sich die folgenden Reaktionen abspielen:

1. Reduktion der CO_2:



2. Reduktion des Chinons:



oder dasselbe nach Abspaltung der CO_2.

Auch die induzierte Atmung bei der CO_2-Assimilation wird durch unsere Formeln chemisch erklärt. Wenn der O_2 im Licht abgespalten worden ist, so muß, damit der Anfangszustand wiederhergestellt wird, der reduzierte Kohlenstoff in Stellung [11] sich ablösen und durch neue Kohlensäure ersetzt werden, was chemische Arbeit erfordert. Diese Arbeit wird dadurch gewonnen, daß in *anderen* belichteten Chlorophyllmolekülen der O_2 seinen ganzen Weg zurückreagiert und dabei —CHO zu —COOH zurückoxydiert. Die bei dieser Oxydation freiwerdende Energie wird dann als ATP oder in anderer Form für die Fixierung der CO_2 zur Verfügung gestellt.

Von allen Assimilationstheorien der Vergangenheit kommt hiernach dem tatsächlichen Sachverhalt am nächsten die Peroxyd-Theorie von WILLSTAETTER und STOLL[3], die zu einer Zeit aufgestellt wurde, als die chemische Konstitution des Chlorophylls noch unbekannt war und als die Photodissoziation des O_2 und die induzierte Atmung noch nicht entdeckt worden waren. So fehlte in der Theorie von WILLSTAETTER und STOLL das Zusammenwirken von Atmungs- und Lichtenergie, und es fehlte näheres über den Ort der Peroxydbildung im Chlorophyllmolekül. Erst durch FISCHER[1], vor allem aber durch CONANT[2] und seine Arbeiten über die Allomerisation des Chlorophylls, ist es möglich geworden, den Ort der Peroxydbildung im Chlorophyllmolekül anzugeben.

Aus unsern Gleichungen folgt, daß es in assimilierenden grünen Zellen 3 Arten von Chlorophyll gibt: solche, die an Stelle [11] ein Carboxyl tragen; solche, deren [11]-Carboxyl reduziert ist; und solche, deren [11]-Stelle frei ist. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß die Chlorophyll-Präparate von FISCHER[5], auch wenn sie kristallisiert waren, zu seinem Leidwesen oft erhebliche Mengen von „Pyro-Chlorophyll" enthielten, das ist Chlorophyll, das an Stelle [11] das Carboxyl abgespalten hat; und daß seine Chlorophyll-Derivate oft erhebliche Mengen Purpurin enthielten, das ist ein Chlorophyll-Derivat, das in [10]-Stellung oxydiert ist. Es ist hier ferner interessant, daß CLENDENNING[6] 30 Sekunden nach Belichtung von Chlorella in $^{14}CO_2$ in der Lipoidfraktion (die das Chlorophyll enthält), Radioaktivität fand. Es sei ferner hervorgehoben, daß nach unseren Gleichungen der gesamte im Licht dissoziierende O_2 aus dem Wasser stammt; daß man aber die Gleichungen leicht so ändern kann, daß die Hälfte des abgespaltenen O_2 aus dem Wasser und die Hälfte aus der CO_2 stammt.

Hierbei ist Chlorophyll die prosthetische Gruppe eines Ferments, das durch chemische Zwischenreaktionen katalytisch wirkt. Aber die chemischen Reaktionen in diesem Ferment sind ihrerseits wiederum Fermentreaktionen, und so ist Raum für die Wirkung des Carotinoido-Ferments (das durch sein Wirkungsspektrum entdeckt worden ist) und für die Schwermetallfermente (die durch das Phenanthrolin und die Blausäure entdeckt worden sind). Auch ist Raum für eine mögliche Beteiligung der Phosphorsäure, wenn man in [11] die Bildung von Acylphosphat annimmt und erst dann die Reduktion vor sich gehen läßt nach Analogie der Oxydationsreaktion der Gärung[6a]. — Was das Endprodukt anbetrifft, so wird heute, nachdem HORECKER die universelle kondensierende Wirkung der Zymohexasen nachgewiesen hat, niemand mehr nach Formaldehyd suchen. Im übrigen könnte in [11] nicht nur Kohlensäure, sondern auch Oxalsäure angelagert werden, bei deren Reduktion dann die von TOLBERT[7] gefundene Glykolsäure entstehen würde. Doch sind dies, wie auch die Frage der Beteiligung der Phosphorsäure, zunächst unwichtige Einzelheiten gegenüber dem Hauptergebnis: daß die CO_2-Assimilation auf einer Wechselwirkung zwischen den C-Atomen [10] und [11] des Chlorophylls beruht, bei der [10] oxydiert und [11] reduziert wird.

Unsere Gleichungen erfüllen ferner eine Forderung, die wir seit 1944, seit der Entdeckung der Chinonreaktion[8] in den isolierten grünen Grana, immer gestellt haben: daß die photochemische O_2-Entwicklung bei der Reduktion der Kohlensäure und des Chinons aus der gleichen Substanz, durch den gleichen Mechanismus erfolgen muß. Tatsächlich unterscheiden sich Grana und intakte Zellen nur dadurch, daß in den Grana die Fermente fehlen, die für die Wechselwirkung zwischen den C-Atomen [10] und [11] verantwortlich sind.

Schließlich ist durch unsere Gleichungen die Photosensibilisierung aus der CO_2-Assimilation eliminiert worden und damit alles, was mit Radikalen, aktiven Zuständen und Lebensdauern zusammenhängt. Denn nunmehr wirkt die Lichtenergie in demselben Molekül, in dem sie absorbiert wird.

Literatur

1 Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., und Buchholz, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 769; O. Warburg, und W. Schröder 10b (1955), 639.

2 Conant, J. B., J. Amer. chem. Soc. 53 (1931), 359, 1615, 2382, 3171; Science (New York) 73 (1931), 268.

3 Willstaetter, R., und Stoll, A., Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918.

4 Fischer, H., und Stern, A., Chemie des Pyrrols, Band II, 2, Leipzig 1940.

5 Fischer, H., und Riedmair, I., Liebigs Ann. Chem. 506 (1933), 107.

6 Clendenning, K. A., Arch. Biochemistry 27 (1950), 75.

6a Warburg, O., Biochem. Z. 303 (1939), 40.

7 Tolbert, N. E., Fed. Proc. 14 (1955), 292.

8 Warburg, O., und Lüttgens, W., Naturwissenschaften 32 (1944), 161, 301; O. Warburg, Heavy Metals, Clarendon Press, Oxford 1949.

31c Über die funktionelle Carboxylgruppe des Chlorophylls*

Von Otto Warburg und Günter Krippahl

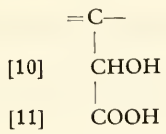
Wie wir vor kurzem mitgeteilt haben[1], enthält das Chlorophyll lebender Chlorella eine Carboxylgruppe, deren Sauerstoff bei Belichtung über ein Chlorophyllperoxyd als molekularer Sauerstoff abgespalten wird. Wir haben nunmehr gefunden, daß man diese „funktionelle" Carboxylgruppe des Chlorophylls, ohne die Chlorella zu töten oder zu schädigen, durch Natriumfluorid abspalten kann. Dabei erscheint pro Mol Chlorophyll 1 Mol CO_2, und zwar um so schneller, je größer die Konzentration des Fluorids ist. $4 \cdot 10^{-3}$-n. Fluorid treibt die CO_2 in etwa 20 Minuten aus. Zum Beispiel gaben wir in den Hauptraum eines Manometriegefäßes ($v = 87{,}7$ ccm) 1500 cmm Chlorella, suspendiert in 25 ccm Salzlösung (pH 3,8); in die Ansatzbirne 1 ccm $n/10$-Natriumfluorid, mit H_2SO_4 auf pH 3,8 angesäuert; in den Gasraum Argon. Wurde dann das Fluorid in den Hauptraum gegeben, so erschienen bei 20^0 die folgenden Mengen an CO_2: nach 5 Minuten 354 cmm, nach 10′ 527 cmm, nach 15′ 580 cmm, nach 20′ 592 cmm, als Endwert also 26,4 μMole CO_2, während die Chlorophyllbestimmung 27,2 μMole Chlorophyll ergab. Wurde das Chlorophyll aus den Zellen durch Ausbleichen im Licht entfernt, so entwickelte Fluorid keine CO_2. Wurde der Chlorophyllgehalt der Chlorella, durch Variation ade Lichtstärke bei der Zucht, im Verhältnis $1 : {}^1/_2 : {}^1/_7$ variiert, so standen die ursgetriebenen CO_2-Mengen im gleichen Verhältnis, wodurch bewiesen wurde, daß die durch Fluorid austreibbare CO_2 aus dem Chlorophyll stammt.

Die Austreibung der CO_2 durch Fluorid wird durch 10^{-4}-n. HCN fast vollständig gehemmt. Erhitzt man die Chlorella-Suspension 5 Minuten auf 65^0 oder trocknet man die Suspension in gefrorenem Zustand, so wird bei Zugabe von Fluorid keine CO_2 ausgetrieben. Die Austreibung ist also ein eng mit dem Leben zusammenhängender Vorgang. Wäscht man nach der Austreibung der CO_2 das Fluorid fort, so wird — falls Sauerstoff zugegen ist — abgespaltene CO_2 wieder aufgenommen. Bestimmt man dabei die Wirkung des Lichts unter linearen Intensitätsbedingungen, so zeigt sich, daß die Lichtwirkung in dem Maß verschwindet, als die CO_2 ausgetrieben ist, und in dem Maß wieder erscheint, als die CO_2 wieder gebunden wird. Wurden die mit Fluorid behandelten Zellen weitergezüchtet, so wurden keine wesentlichen Wachstumshemmungen gefunden.

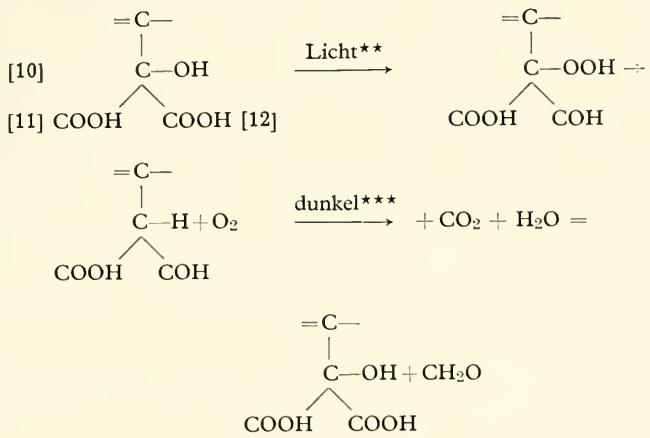
Gewitz und Voelker isolierten nach Austreibung der CO_2 durch Fluorid das Chlorophyll und bestimmten darin das Chlorin e, dessen Menge dem Carboxyl [11] des Chlorophylls proportional ist. Sie fanden keinen Unterschied, ob die CO_2 vorher durch Fluorid ausgetrieben war oder nicht, woraus hervorgeht, daß die funktionelle Carboxylgruppe nicht die Carboxylgruppe [11] des Chlorophylls sein kann:

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 11b (1956): 179.



Chlorophyll muß also im Leben eine weitere Carboxylgruppe enthalten,* die bisher in der Chlorophyllformel nicht verzeichnet ist und von der wir vermuten, daß sie neben Carboxyl [11] an C-Atom [10] gebunden ist. Dann wäre der chemische Mechanismus der CO_2-Assimilation:



Die funktionelle und labile Carboxylgruppe in [12] würde manches erklären, was nach unsrer vorigen Mitteilung noch unklar war. Sie würde erklären, warum bereits Druck auf ein Blatt oder warum Trocknen die CO_2-Assimilation zum Verschwinden bringt. Sie würde ferner erklären, warum das Chlorophyll nicht im Leben, aber nach der Extraktion aus den grünen Zellen autoxydabel ist: weil die nach CONANT[2] zur Autoxydation notwendige Konfiguration —CHOH—COOH erst bei der Extraktion des Chlorophylls, bei der Abspaltung von [12], entstehen würde.

Literatur

1 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. Naturforschg. 11b (1956), 52.
2 CONANT, J. B., Science (New York) 73 (1931), 268.

* *Zusatz 1961.* Diese Mitteilung, die 6 Wochen nach der Arbeit Nr. 31b erschien, enthält die Entdeckung der funktionellen Kohlensäure und ihrer reversibeln Austreibung durch Fluorid, aber noch nicht die Entdeckung der Glutaminsäure und ihrer Funktion bei der Photosynthese. Mit der Entdeckung der funktionellen Kohlensäure war die Theorie widerlegt, daß die funktionelle Kohlensäure die Carboxylgruppe (11) der HANS FISCHERschen Chlorophyllformel ist. Eine halbrichtige Theorie, deren Fehler sehr schnell zurückgenommen wurde, hat so auf den richtigen Weg geführt.

** Erfordert etwa 40000 cal.

*** Mit Hilfe der Energie der induzierten Atmung. Erfordert etwa 60000 cal.

32 Wirkung von Vanadium auf die Photosynthese*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl und Wolfgang Buchholz

Vanadium wirkt bei der Photosynthese als Katalysator der Kohlensäure-Reduktion.

Wie Arnon[1] gefunden hat, ist Vanadium zum autotrophen Wachstum von *Chlorella* notwendig. Bei unsern Versuchen, die Bedingungen festzulegen, unter denen *Chlorella* das Licht maximal ausnutzt, haben wir unserm üblichen Salzmedium Arnons „Microelemente A" zugesetzt — Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Molybdän und Bor — und außerdem Vanadium oder kein Vanadium. 30 cmm *Chlorella* wurden dabei in 250 ccm eingesät. Die Ernte nach 24 Stdn. betrug 250 cmm und nach 48 Stdn. etwa 500 cmm. Lichtquelle war eine 200-Watt-Metallfadenlampe. Die Züchtungstemperatur war 25°. Der Kohlensäuredruck bei der Züchtung betrug $^1/_{20}$ Atmosphäre.

Wir fanden bei der hohen Lichtstärke der Züchtung *mit* und *ohne* Vanadium in 48 Stdn. nahezu das gleiche Wachstum. Anders bei den niedrigeren Lichtstärken, bei denen der Quantenbedarf gemessen wurde. Wurden in das Meßgefäß 50 cmm Quanten der Wellenlänge 546 mμ pro Minute eingestrahlt, unter Zusatz des notwendigen blaugrünen Lichts, so war die Ausbeute an Sauerstoff sehr schlecht, wenn die *Chlorella* ohne Vanadiumzusatz gezüchtet worden war; und das Verhältnis $\gamma = CO_2/O_2$ war sehr niedrig, das heißt, es wurde viel weniger Kohlensäure absorbiert, als Sauerstoff entwickelt. Wurde dann so viel Vanadium zugesetzt, daß die Vanadiumkonzentration 2×10^{-6} molar war, so stieg sofort die Ausbeute an Sauerstoff, und es wurde sofort eine dem Sauerstoff etwa äquivalente Menge an Kohlensäure absorbiert, zum Beispiel:

Ohne Zusatz von Vanadium in 30′: $x_{O_2} + 12$ cmm; $x_{CO_2} - 2$ cmm,
$+ 2 \times 10^{-6}$ molar Vanadium in 30′: $x_{O_2} + 55$ cmm; $x_{CO_2} - 64$ cmm.

Das Vanadium wurde dabei als 5wertiges Vanadium, als gelbes Na-Salz der Säure HVO_3, zugesetzt. Wurde statt dessen das blaue Vanadylsulfat zugesetzt, in dem das Vanadium 4wertig ist, so wurden *keine* Wirkungen des Vanadiums beobachtet. Um diese Unterschiede festzustellen, müssen die Lösungen frisch bereitet werden, da an der Luft in Lösungen von Vanadylsulfat auf die Dauer 5wertiges Vanadium entsteht.

Aus der sofortigen Wirkung des zugesetzten Vanadiums auf das Verhältnis CO_2/O_2 folgt, daß es von den Teilvorgängen der Photosynthese die Reduktion der Kohlensäure ist, an der das Vanadium beteiligt ist.

---

*Aus Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955): 422.

Literatur

1 Arnon, D., Nature (London) 172 (1953), 1039.

33 Photochemische Wasserzersetzung durch lebende Chlorella*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Lebende Chlorella reduziert im Licht Ferricyanid katalytisch unter Entwicklung von Sauerstoff. Diese photochemische Wasserzersetzung wird in eine Dunkel- und eine Hell-Reaktion zerlegt.

1939 fand Hill[1], daß isolierte Chloroplasten im Licht Ferri-Oxalat reduzieren und daß dabei Sauerstoff entwickelt wird nach der Gleichung:

$$4\,Fe^{+++} + 2\,H_2O = 4\,Fe^{++} + 4\,H^+ + O_2. \qquad [1]$$

Da Ferro-Oxalat autoxydabel ist, kann hierbei Sauerstoff nur bis zu sehr niedrigen Drucken entwickelt werden; und da Ferri-Oxalat im Licht — ohne Chloroplasten — unter CO_2-Entwicklung reduziert wird, ergeben sich bei photochemischen Versuchen mit Ferri-Oxalat Komplikationen, die vermieden werden, wenn man, wie wir in unseren Versuchen mit grünen Grana[2] zeigten, Ferricyanid als Eisensalz benutzt. Ferricyanid ist viel lichtbeständiger als Ferr*i*-Oxalat, und Ferr*o*cyanid ist nicht autoxydabel, so daß man Sauerstoff bis zu beliebigen Drucken entwickeln kann, wenn man Ferricyanid und grüne Grana im Licht zusammenbringt.

Bei der Fortsetzung dieser Versuche haben wir gefunden, daß man — merkwürdigerweise — die grünen Grana durch *lebende* Chlorella ersetzen kann, die also wie grüne Grana im Licht Wasser nach Gleichung [1] zersetzt. Große Mengen an Ferricyanid können dabei durch wenig Chlorella reduziert werden, ohne wesentliche Schädigung der Chlorella, so daß es, aus methodischen Gründen, aussichtsreich erschien, die photochemische Wasserzersetzung mit *lebender Chlorella* als Versuchsobjekt näher zu untersuchen.

Es zeigte sich dabei, daß Ferricyanid durch lebende Chlorella auch im Dunkeln reduziert wird, und zwar, wenn die Lösungen genügend Sauerstoff enthalten, nur wenig langsamer als im Licht; daß aber im Dunkeln nicht Sauerstoff, sondern Kohlensäure erscheint, entsprechend der Gleichung:

$$4\,Fe^{+++} + C + 2\,H_2O = 4\,Fe^{++} + 4\,H^+ + CO_2. \qquad [1a]$$

Im Licht folgt auf diese Dunkelreaktion die Reaktion:

$$CO_2 = C + O_2 \qquad [1b]$$

und die Bilanz ist die Sauerstoffentwicklung aus Wasser gemäß Gleichung [1]. Die photochemische Wasserzersetzung durch Eisen beruht also auf der katalytischen Wirkung einer Kohlenstoffverbindung, die in einer Dunkelreaktion zu CO_2 oxydiert und in einer Hellreaktion — der Photosynthese — wieder zurückreduziert wird.

Von den Eigenschaften der Dunkelreaktion ist erwähnenswert, daß sie bei Gegen-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 10b (1955): 301.

Zusatz 1961. Seit dieser Arbeit waren wir der Überzeugung, daß alle „Hillreaktionen" Photolysen der Kohlensäure, nicht Photolysen des Wassers sind. 5 Jahre später (Arbeit 56 dieses Buchs) wurde der Beweis erbracht.

wart von Sauerstoff schneller verläuft als bei Abwesenheit von Sauerstoff; und daß sie durch Phenanthrolin spezifisch gehemmt wird, daß also an der Dunkelreaktion eine dissoziierende Schwermetallverbindung beteiligt ist.

I. Methoden

Zellen. Chlorella wurden, wie kürzlich beschrieben[3], gezüchtet. Mehrtägige Kulturen, die pro Zuchtkolben in 250 ccm 1000 bis 2000 cmm Zellen enthielten, wurden für die Versuche verwendet. Die Zellen wurden 2-mal in $m/10$-Phosphat pH 6,5 oder 4,3 gewaschen und dann auf die gewünschte Zelldichte mit der gleichen Phosphatlösung aufgefüllt.

Bestimmung des Ferro-Eisens. Die Konzentration des Ferricyanids, das als $K_3Fe(CN)_6$ zugesetzt wurde, war im allgemeinen $^1/_{100}$ molar. Nach dem Versuch wurden die Zellen abzentrifugiert, in der überstehenden Flüssigkeit wurde das entstandene Ferrocyanid, nach Ansäuern, mit $n/100$-Permanganat titriert. In den Kontrollen ohne Eisenzusatz wurde niemals Permanganat verbraucht.

Manometrie. Kegelförmige Gefäße von den ungefähren Abmessungen $v = 17{,}2$, $v_f = 4{,}2$, $k_{O_2}{}^{20^0} = 1{,}2$, $k_{CO_2} = 1{,}55$, wurden verwendet. Die Mengen an Zellen und Eisen waren so bemessen, daß die manometrischen Ausschläge in 1 Stde. 150—200 mm betrugen. Der Gasraum enthielt Argon oder Luft. Die Manometer wurden ohne Unterbrechung der Schüttelbewegung abgelesen. Die Thermostatentemperatur betrug 20^0.

Als Lichtquellen dienten 200-Watt-Metallfadenlampen, deren Glaskörper direkt in das Thermostatenwasser neben die Kegelgefäße versenkt wurde. Die Lichtstärke war dann sehr groß. Bei gleichem γ' von Atmung und Photosynthese waren dann die Druckänderungen im Licht, wenn kein Eisen zugesetzt wurde, Null. Die Druckänderungen, die im Licht auftraten, konnten also, bei kohlensäure-freien Gasräumen, nur von der Eisenreaktion herrühren. Um Gasraum, Lösungen und Zellen von Kohlensäure zu befreien, wurde vor Zugabe des Eisens immer bis zur Druckänderung Null belichtet.

Sollte neben dem Sauerstoff auch die Kohlensäure bestimmt werden, so wurde ein Gefäßpaar angesetzt, von dem nur das *eine* Gefäß Kalilauge im Einsatz enthielt. War pH 6,5, so mußte bei der Berechnung die Retention der Kohlensäure berücksichtigt werden, die bei 20^0, pro mm Brodie, pro ccm $m/10$-Phosphat $R = 0{,}189$ mm^3 betrug. Da $m/10$-Phosphat des pH 4,3 nicht retiniert, so wurde, wenn die Kohlensäure mitbestimmt werden sollte, oft bei pH 4,3 gearbeitet, wobei in Kauf genommen wurde, daß dann die Eisenreduktion etwas langsamer verlief als bei pH 6,5.

II. Reduktion des Ferricyanids im Licht

In den Hauptraum von 4 Kegelgefäßen wurden je 4 ccm $m/10$-Phosphat pH 6,5 gegeben, die je 200 cmm Chlorella enthielten. Die Ansatzbirnen von 2 Gefäßen blieben leer, in die Ansatzbirne der beiden anderen Gefäße wurde je 0,2 ccm $m/5$-$K_3Fe(CN)_6$ gegeben. Die Einsätze aller Gefäße enthielten je 0,1 ccm 20proz. Kalilauge. Der Gasraum von 2 Gefäßen enthielt Argon, der Gasraum der beiden andern Gefäße enthielt Luft. Während des Ausgleichs wurde belichtet, um alle Kohlensäure in Zellen und Lösungen umzusetzen. Dann wurde das Ferricyanid in den Hauptraum gegeben und weiter bis zur Beendigung der Druckentwicklung belichtet. Waren die End-Drucke abgelesen, so wurden die Zellen abzentrifugiert, in den überstehenden Lösungen wurde das gebildete Ferrocyanid mit $n/100$-$KMnO_4$ titriert. Zum Beispiel fanden wir 55 Min. nach Zugabe des Ferricyanids in den Hauptraum (vgl. Abb. 1):

mit Eisen,
Gasraum Argon + 226 cmm O_2 } = + 218 cmm
ohne Eisen,
Gasraum Argon + 8 cmm O_2 } = 98% der Theorie

mit Eisen,
Gasraum Luft + 186 cmm O_2 } = + 193 cmm
ohne Eisen,
Gasraum Luft — 6 cmm O_2 } = 86% der Theorie

während in jedem der beiden Gefäße, denen Ferricyanid zugesetzt war, ein $n/100$-Permanganat-Verbrauch von 4 ccm gefunden wurde, d. h., 40 μMole Eisen waren

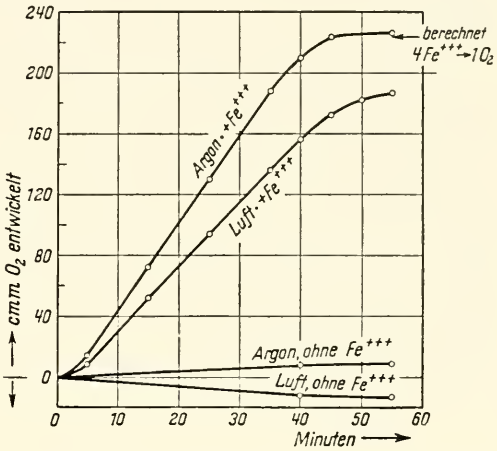


Abb. 1. Sauerstoffentwicklung aus 200 cmm Chlorella in starkem Licht, mit oder ohne Zusatz von Ferricyanid, in Argon oder in Luft.

reduziert worden, 9—10 μMole Sauerstoff waren entwickelt worden, das Verhältnis Eisenverbrauch/Sauerstoffentwicklung war also, gemäß Gleichung [1], nahezu gleich 4.

III. Reduktion des Ferricyanids im Dunkeln

Wie in Abschnitt II, waren 200 ccm Chlorella in 4 ccm Phosphatlösung pH 6,5 suspendiert. Anders als in Abschnitt II erhielten alle 4 Gefäße Eisen, 2 von den 4 Gefäßen blieben verdunkelt. Zum Beispiel fanden wir, daß 45 Min. nach Zugabe von 40 μMolen Ferricyanid die folgenden Eisenmengen verbraucht worden waren:

Gasraum	[μMole]
Luft, hell	38
Luft, dunkel	27
Argon, hell	38
Argon, dunkel	9,5

Vergleichen wir zunächst Luft hell und dunkel, so ergibt sich, daß die Reduktionsgeschwindigkeit des Eisens im Dunkeln 70% der Hellgeschwindigkeit beträgt. In anderen Versuchen war der Unterschied zwischen hell und dunkel noch kleiner; im ganzen fanden wir im Dunkeln 70—90% der Hellgeschwindigkeit.

Vergleichen wir Argon hell und dunkel, so ergibt sich, daß die Reduktionsgeschwindigkeit des Eisens im Dunkeln nur 25% von der Hellgeschwindigkeit beträgt, während im Licht (Vergleich Luft—hell und Argon—hell) die Reduktionsgeschwindigkeiten des Eisens gleich sind. Es ist daraus zu schließen, daß Sauerstoff die Reduktion des Eisens begünstigt. Im Licht, wenn die Zellen Sauerstoff entwickeln, scheint die Sauerstoffkonzentration immer optimal zu sein, auch wenn der Gasraum anfangs nur Argon enthielt.

IV. Kohlensäurebildung bei der Eisenreduktion im Dunkeln

Gibt man im Dunkeln Ferricyanid zu Chlorella, die mit Luft gesättigt ist, und mißt den Gaswechsel mit und ohne KOH im Einatz, so findet man zwei Wirkungen des Eisens:

1. Die Sauerstoffatmung steigt erheblich an, während man hätte erwarten können, daß das Eisen den Sauerstoff „ersetze" und also der Sauerstoffverbrauch kleiner würde.

2. Außer der Kohlensäure, die dem erhöhten Sauerstoffverbrauch äquivalent ist, erscheint Extra-Kohlensäure, die in einem stöchiometrischen Verhältnis zu der reduzierten Eisenmenge steht.

Zur Messung des Gaswechsels wurden in 4 Kegelgefäße je 4 ccm $m/10$-Phosphat pH 4,3 gegeben, die je 200 cmm Chlorella enthielten. Von den Ansatzbirnen blieben zwei leer, während zwei je 0,2 ccm $m/5$-$K_3Fe(CN)_6$ enthielten. Von den Einsätzen blieben zwei leer, während zwei je 0,1 ccm 20proz. Kalilauge enthielten. Die Gasräume enthielten Luft. Alle 4 Gefäße blieben verdunkelt. Wir fanden 90 Min. nach Zugabe der 40 μMole Ferricyanid den folgenden Sauerstoffverbrauch x_{O_2} und die folgende Kohlensäurebildung x_{CO_2}:

$$\left.\begin{array}{l}\text{ohne Eisen, + KOH}\\ \text{ohne Eisen, — KOH}\end{array}\right\}\left.\begin{array}{l}x_{O_2}\ -\ 220\text{ cmm}\\ x_{CO_2}\ +\ 200\text{ cmm}\end{array}\right\}\ x_{CO_2}/x_{O_2} = -0{,}91$$

$$\left.\begin{array}{l}\text{+ Eisen, + KOH}\\ \text{+ Eisen, — KOH}\end{array}\right\}\left.\begin{array}{l}x_{O_2}\ -\ 405\text{ cmm}\\ x_{CO_2}\ +\ 545\text{ cmm}\end{array}\right\}\ \begin{array}{l}\text{Extra-}CO_2 = 545 - 0{,}91 \times 405\\ \quad = 175\text{ cmm}\\ \quad = 7{,}8\ \mu\text{Mole.}\end{array}$$

Die Titration des reduzierten Eisens nach 90 Min. ergab in jedem der beiden mit Eisen versetzten Gefäße einen Verbrauch von 3,25 ccm $n/100$-$KMnO_4$, d. h. 32,5 μMole Fe waren reduziert worden, während 7,8 μMole Extra-CO_2 erschienen waren, also:

$$\frac{\text{Fe reduziert}}{\text{Extra } CO_2} = \frac{32{,}5}{7{,}8} = 4{,}17.$$

Die Gleichung der Dunkelreaktion ist hiernach:

$$4\ Fe^{+++} + C + 2\ H_2O = 4\ Fe^{++} + 4\ H^+ + CO_2.$$

V. Zeitliche Trennung von Dunkelreaktion und Hellreaktion bei der photochemischen Wasserzersetzung

Wenn bei der Wasserzersetzung zunächst in einer Dunkelreaktion Kohlensäure entsteht und dann die Kohlensäure durch das Licht unter Sauerstoffentwicklung reduziert wird, so muß es für den Endeffekt gleichgültig sein, ob man *während* der Eisen- Reduktion belichtet oder ob man zunächst das Eisen im Dunkeln reagieren läßt und *dann* belichtet. Auf beiden Wegen sollte man den gleichen Endwert an entwickeltem Sauerstoff erhalten. In Wirklichkeit erhält man immer etwas mehr Sauerstoff, wenn man das Eisen zunächst im Dunkeln reagieren läßt und erst dann belichtet, woraus folgt, daß im Licht eine kleine Menge Eisen so reagiert, daß keine Kohlensäure entsteht. Dieses Eisen ist dann für die Sauerstoffbildung verloren.

Die manometrische Methode beruht auf der Tatsache, daß Kohlensäure bei

Gegenwart von stark belichteter Chlorella nicht beständig ist, d. h., daß die Enddrucke, die man im Licht erhält, nur Sauerstoffdrucke sein können; daß man also den entwickelten Sauerstoff durch Multiplikationen der Enddrucke mit den *einfachen* Gefäßkonstanten k_{O_2} erhält. Natürlich dürfen die Einsätze der Gefäße bei dem Versuch keine Kalilauge enthalten, da sonst die im Dunkeln entwickelte Kohlensäure in die Kalilauge ginge und bei der folgenden Belichtung keinen Sauerstoff geben könnte. In starkem Licht jedoch ist es gleichgültig, ob die Gefäße im Einsatz Kalilauge enthalten oder nicht. Denn in starkem Licht wird die Kohlensäure so schnell reduziert, daß sie nicht in den Gasraum entweichen kann.

Zum Beispiel wurde in zwei Kegelgefäße je 4 ccm $m/10$-Phosphat pH 6,5 gegeben, die je 200 cmm Chlorella enthielten. Die Ansatzbirnen enthielten je 0,2 ccm $m/5$-$K_3Fe(CN)_6$. Die Einsätze blieben leer. Die Gasräume enthielten Luft. Zunächst wurde im Hellen ausgeglichen, um beide Gefäße von Kohlensäure zu befreien. Dann wurde bei t_0 das Eisen in die Haupträume der Gefäße gegeben, von denen das eine hell und das andere verdunkelt war. War die Druckentwicklung in dem Hellgefäß beendet, so wurde der Druck h abgelesen und die Sauerstoffentwicklung $x_{O_2} = h \times k_{O_2}$ berechnet. Gleichzeitig begann die Belichtung des Dunkelgefäßes. War hier die Druckentwicklung beendet, so wurde auch für dieses Gefäß die Sauerstoffentwicklung $x_{O_2} = h \times k_{O_2}$ berechnet.

Wir fanden:

Sofort nach Eisenzusatz belichtet. Endwert nach 55 Min.:
$x_{O_2} = 195$ cmm $= 8{,}7$ μMole.

Eisen zunächst im Dunkeln reduziert, dann 40 Min. hell:
$x_{O_2} = 208$ cmm $= 9{,}3$ μMole.

Die Titration des reduzierten Eisens nach Beendigung der manometrischen Messung ergab für jedes Gefäß 4,05 ccm $n/100$-$KMnO_4$. Das Verhältnis von Eisenreduktion zu Sauerstoffentwicklung war also:

Wenn das Eisen *während der Belichtung* reduziert wurde: $40{,}5/8{,}7 = 4{,}65$.
Wenn das Eisen *im Dunkeln* reduziert und dann belichtet wurde: $40{,}5/9{,}7 = 4{,}2$.

VI. Phenanthrolin

α-α'Phenanthrolin, das bei der Aufklärung des chemischen Mechanismus der Photosynthese eine Rolle spielen wird, hemmt in etwa $^1/_{500}$-molarer Lösung spezifisch und reversibel

1. die Photosynthese[2],

2. die photochemische Entwicklung des Sauerstoffs aus grünen Grana, denen Chinon zugesetzt ist[2],

3. die photochemische Austreibung der Sauerstoff-Kapazität aus Chlorella[1],

während die Atmung der Chlorella, soweit sie nicht mit der Photosynthese zusammenhängt, von Phenanthrolin nicht gehemmt wird.

Wir können nunmehr zu den 3 hemmbaren Vorgängen einen 4. hinzufügen. Wir fanden, daß die Ferricyanid-Reduktion durch Phenanthrolin stark gehemmt

wird. Wenn z. B. 4 ccm $m/10$-Phosphat pH 6,5 die 300 cmm Chlorella und 40 μMole $K_3Fe(CN)_6$ enthielten, mit und ohne Plenanthrolin 30 Min. in Luft im Dunkeln geschüttelt wurden, so fanden wir in der überstehenden Flüssigkeit den folgenden Verbrauch an Permanganat:

$$\text{Verbrauch von } \frac{n}{100}\text{-}KMnO_4$$

ohne Phenanthrolin 3,8 ccm = 38 μMole Fe^{++},
in $m/400$-Phenanthrolin 1,55 ccm = 15,5 μMole Fe^{++}.

Die Eisenreduktion wurde also durch $m/400$-Phenanthrolin um rund 60% gehemmt.

Auch Blausäure hemmt die Ferricyanid-Reduktion. Doch hemmt Blausäure nicht so stark wie Phenanthrolin.

VII. Wieviel Ferricyanid kann Chlorella reduzieren?

Da im Licht das Ferricyanid in der Bilanz Wasser zerlegt, kann im Licht eine gegebene Menge Chlorella beliebige Mengen Ferricyanid reduzieren. Unsere Frage hat also nur Sinn, wenn sie sich auf die Dunkelreaktion bezieht, bei der Ferricyanid in der Bilanz eine Kohlenstoffverbindung oxydiert. Wieviel derartig reaktionsfähiger Kohlenstoff ist in einer gegebenen Menge Chlorella enthalten?

Wir gaben in eine Gaswaschflasche von 250 ccm Inhalt 95 ccm $m/10$-Phosphat pH 6,5 + 5 ccm $m/5$-$K_3Fe(CN)_6$ + 500 cmm Chlorella und leiteten im Dunkeln, bei Zimmertemperatur, 45 Stdn. Luft durch die Flasche. In geeigneten Zeitabständen entnahmen wir 4 ccm der Suspension und bestimmten nach Zentrifugieren in der überstehenden Lösung das gebildete Ferrocyanid durch Titration mit Kaliumpermanganat. Da nach 21 Stdn. fast alles Eisen reduziert war, setzten wir nach 21 Stdn. die Anfangsmenge an Ferricyanid nochmals zu. Der gefundene Permanganat-Verbrauch war:

Min.	Verbrauch von $n/100$-$KMnO_4$ in 4 ccm Zellsuspension
0	0
30	0,3
100	0,9
195	1,25
300	1,70
580	2,40
1270	3,60
neues Fe 1405	4,05
1585	4,60
1765	4,95
2700	6,10

In 45 Stdn. hatten also 20 cmm Zellen = 5 mg Trockensubstanz 61 μMole = 20 mg $K_3Fe(CN)_6$ zu Ferrocyanid reduziert und 61/4 = 15 μMole = 0,66 mg Kohlensäure gebildet, das sind 13% des Trockengewichts der Zellen.

Nach Beendigung des Versuchs, also nach 45 Stdn., wurden die Zellen auf der Zentrifuge mit Kulturlösung gewaschen. Bei der Kultur vermehrten sich 60 cmm

dieser Zellen in 20 Stdn. auf 250 cmm, während Kontrollzellen unter sonst gleichen Bedingungen sich von 60 auf 340 cmm vermehrten. Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Chlorella hatte also durch die lange Berührung mit Ferri- und Ferrocyanid nicht wesentlich gelitten.

Literatur

1 Hill, R., Proc. Royal Soc. (London), Ser. B, 127 (1939), 192; R. Hill und R. Scarisbrik, ebenda 129 (1940), 238.

2 Warburg, O., und Lüttgens, W., Die Naturwissenschaften 32 (1944), 161 und 301; O. Warburg, Heavy Metals and Prosthetic Groups. Clarendon Press, Oxford 1949.

3 Warburg, O., Krippahl, K., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 667.

4 Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., und Buchholz, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 769.

34 Über die Messung des Energieumsatzes bei der Photosynthese mit dem Großflächen-Bolometer*

Von Otto Warburg

Das Großflächen-Bolometer, von Lummer und Kurlbaum[1] in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt um 1900 entwickelt, ist bei den grundlegenden Arbeiten der Photochemie von Emil Warburg[2] als Strahlungsmesser benutzt worden. Das gleiche Instrument wurde bei den Messungen des Energieumsatzes der Photosynthese angewendet, 1920 in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt[3] und in den folgenden Jahren im Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie in Dahlem[4].

Da es keinen, für photosynthetische Experimente geeigneteren absoluten Strahlungsmesser gibt als das Lummer-Kurlbaum-Bolometer, veranlaßte ich 1945 in Berlin die Wiederherstellung dieser Instrumente mit dem Erfolg, daß die Firma Lassen**, Berlin vor kurzem 2 Großflächen-Bolometer nach den USA. liefern konnte, das eine nach Madison (Wisconsin) in das Laboratorium von Farrington Daniels, das andere nach Berkeley (Calif.) in das Laboratorium von Melvin Calvin.

Der Energieumsatz bei der Photosynthese ist dadurch in den U. S. A. in bemerkenswerter Weise angestiegen. Während Rabinowitsch[5] aus dem Laboratorium von Emerson, noch im Jahre 1952 einen mittleren Quantenbedarf von 12 pro Molekül Sauerstoff meldete, nennt 1955 Daniels[6] als Mittelwert des von ihm gefundenen Quantenbedarfs die Zahl 8.9 und Calvin[7] sogar die Zahl 4.9, wenn bei niedrigen Intensitäten — unter den Bedingungen unserer Versuche[3] von 1920 — die Dunkelatmung zu dem im Licht entwickelten Sauerstoff addiert wurde.

Trotz dieser Besserung schienen mir die Differenzen zwischen Daniels und Calvin noch so erheblich zu sein, daß man Fehler in ihren Arbeiten vermuten mußte. Tatsächlich sind in beiden Arbeiten, wie im folgenden gezeigt wird, wesentliche Fehler bei der Messung der Lichtabsorption gemacht worden.

Die Arbeit von Daniels

Um die Absorption des Lichts in *Chlorella*-Suspensionen zu messen, werden sie von Daniels in den Weg des zum Bolometer gerichteten Lichtstrahls gebracht. Daniels bestimmt dann *vor* und *hinter* der Zellsuspension die bolometrischen Ausschläge und nimmt an, daß die Differenz von der Lichtabsorption in den Pigmenten der *Chlorella* herrührt. In Wirklichkeit jedoch rührt der gefundene Lichtverlust nur zum Teil von der Absorption des Lichts her; ein anderer Teil des Lichts wird von der *Chlorella*-Suspension so zerstreut, daß er nicht auf die Platinstreifen des Bolometers, sondern auf die Wände des Bolometergehäuses trifft.

Der so entstehende Fehler ist erheblich. Bestimmten wir für eine gegebene Zellsuspension die Absorption der Wellenlänge 546 mμ einmal mit der Ulbricht'schen Kugel — wobei kein zerstreutes Licht verlorengeht[8] — und dann nach der Vor-

* Republished from Biochim. et Bioph. Acta 18 (1955): 163.

** Jetzt Firma Röhrig, Berlin SO, Erkelenzdamm 59.

schrift von DANIELS mit dem Bolometer, so fanden wir zum Beispiel mit der Kugel 25% Absorption, mit der Methode von DANIELS aber, je nach der Ausleuchtung der Zellsuspension, 40% bis 60% Absorption. Natürlich erhält DANIELS unter solchen Umständen, indem er eine viel zu hohe Absorption in seine Rechnungen einsetzt, eine viel zu niedrige Ausbeute an chemischer Energie.

Im blau jedoch, das stärker als grün absorbiert wird und das in den Versuchen von DANIELS fast vollständig absorbiert wurde, war der Zerstreuungsverlust geringer und so erhielt DANIELS im blau eine viel bessere Energieausbeute als im grün, nämlich einen Quantenbedarf um 6, eine erfreuliche Annäherung an den Blau-Wert 5 von WARBURG und NEGELEIN von 1923, wenn man bedenkt, daß DANIELS noch im Jahre 1938 einen mittleren Quantenbedarf von 157 fand[9] (vergl. seine Tabelle III).

Die Arbeit von Calvin

Um den durch die Zerstreuung bewirkten Fehler bei Absorptionsmessungen zu vermeiden, ersetzte CALVIN das Fenster im Bolometergehäuse durch ein Opalglas, in der Hoffnung, das in das Bolometer eindringende Licht so weit zu zerstreuen, daß die vor das Opalglas gebrachten *Chlorella*-Suspensionen das Licht nicht weiter zerstreuen könnten.

In Wirklichkeit ist auch CALVINS Anordnung fehlerhaft, *wegen der zusätzlichen* Zerstreuung, die entsteht, wenn man die *Chlorella*-Suspension vor das Opalglasfenster bringt. Zum Beweis bestimmten wir für eine gegebene Zellsuspension die Lichtabsorption einmal mit der Ulbricht'schen Kugel und dann nach CALVIN mit Bolometer und Opalglasfenster und fanden wesentlich höhere Absorptionen mit der Methode von CALVIN als mit der Kugel. Zum Beispiel fanden wir im grün nach CALVIN 43% Absorption und mit der Kugel 25% Absorption. Natürlich erhielt so CALVIN, indem er zu hohe Absorptionen einsetzte, zu niedrige Ausbeuten an chemischer Energie.

Wenn keine Ulbricht'sche Kugel zur Verfügung steht, kann man sich leicht mit Hilfe von „weißer" *Chlorella*[8] von der Fehlerhaftigkeit der Methoden von DANIELS und CALVIN überzeugen. Bringt man eine Suspension von *Chlorella*, aus der die Pigmente mit Methanol extrahiert worden sind, vor das Bolometer in der Anordnung von DANIELS oder in der Anordnung von CALVIN, so findet man immer eine erhebliche, scheinbare Lichtabsorption, obwohl doch in den Zellen nichts mehr ist, was das Licht absorbieren könnte.

Literatur

1 LUMMER, O., und KURLBAUM, F., Wiedemanns Ann. Physik 46 (1892), 204; KURLBAUM, F., ibid. 65 (1898), 746.

2 Anwendung des Bolometers bei photochemischen Arbeiten: WARBURG, EMIL, LEITHÄUSER, G., HUPKA, E., und MÜLLER, C., Ann. Physik 40 (1913), 609; WARBURG, E., und MÜLLER, C., Verhandl. deut. physik. Ges. 18 (1916), 245; WARBURG, E., Z. Elektrochem. 27 (1921), 135; 26 (1920), 54 und 27 (1921), 133.

3 MÜLLER, C., und WARBURG, OTTO, Sitzungsberichte der Preußischen Akademie der Wissenschaften, Sitzung vom 21. Oktober, 1920, Seite 733.

4 WARBURG, O., und NEGELEIN, E., Z. physik. Chem. 102 (1922), 236; ibid. 106 (1923), 191.

5 EHRMANTRAUT, H., und RABINOWITSCH, E., Arch. Biochem. and Biophys. 38 (1952), 67.

6 LUNG YUAN, E., EVANS, ROBERT W., und DANIELS, FARRINGTON, Biochim. Biophys. Acta 17 (1955), 185.

7 BASSHAM, JAMES A., SHIBATA, KAZUO, und CALVIN, MELVIN, Biochim. Biophys. Acta 17 (1955), 332.

8 WARBURG, OTTO, und KRIPPAHL, GÜNTER, Z. Naturforsch. 9b (1954), 181.

9 MANNING, W. M., STAUFFER, J. F., DOUGLAS, B. M., und DANIELS, F., J. Am. Chem. Soc. 60 (1938), 266.

35 On the Origin of Cancer Cells*

By Otto Warburg

Our principal experimental object for the measurement of the metabolism of cancer cells is today no longer the tumor but the ascites cancer cells [1] living free in the abdominal cavity, which are almost pure cultures of cancer cells with which one can work quantitatively as in chemical analysis. Formerly, it could be said of tumors, with their varying cancer cell content, that they ferment more strongly the more cancer cells they contain, but today we can determine the absolute fermentation values of the cancer cells and find such high values that we come very close to the fermentation values of wildly proliferating *Torula* yeasts.

What was formerly only qualitative has now become quantitative. What was formerly only probable has now become certain. The era in which the fermentation of the cancer cells or its importance could be disputed is over, and no one today can doubt that we understand the origin of cancer cells if we know how their large fermentation originates, or, to express it more fully, if we know how the damaged respiration and the excessive fermentation of the cancer cells originate.

Energy of Respiration and Fermentation

We now understand the chemical mechanism of respiration and fermentation almost completely, but we do not need this knowledge for what follows, since *energy alone* will be the center of our considerations. We need to know no more of respiration and fermentation here than that they are energy-producing reactions and that they synthesize the energy-rich adenosine triphosphate, through which the energy of respiration and fermentation is then made available for life. Since it is known how much adenosine triphosphate can be synthesized by respiration and how much by fermentation, we can write immediately the potential, biologically utilizable energy production of any cells if we have measured their respiration and fermentation. With the ascites cancer cells of the mouse, for example, we find an average respiration of 7 cubic millimeters of oxygen consumed per milligram, per

---

* Reprinted from Science 123 (1956): 309 by permission.

Zusatz 1961. Der in diesem Vortrag beschriebene Fortschritt ist der Übergang von den Tumoren, die alle Mischgewebe sind, zu den freien Krebszellen: zu den Ascites-Krebszellen und zu den in vitro gezüchteten Krebszellen der Earle-schen Schüttelkulturen, deren Untersuchung Dean Burk in einem Addendum beschreibt. Im übrigen aber sind viele Ideen des Vortrags heute als überholt zu betrachten, zum Beispiel die Entstehung des Krebsstoffwechsels durch Selektion, die Wirkungsweise der Röntgenstrahlen bei der Abtötung der Krebszellen und auch die Verminderung der Zellgrana als Ursache der zu niedrigen Atmung der Krebszellen. Trotzdem habe ich den Vortrag in unsere Sammlung aufgenommen, um zu zeigen, in wie schneller Entwicklung die hier diskutierten Probleme heute begriffen sind.

hour, and fermentation of 60 cubic millimeters of lactic acid produced per milligram, per hour. This, converted to energy equivalents, means that the cancer cells can obtain approximately the same amount of energy from fermentation as from respiration, whereas the normal body cells obtain much more energy from respiration than from fermentation. For example, the liver and kidney of an adult animal obtain about 100 times as much energy from respiration as from fermentation.

I shall not consider aerobic fermentation, which is a result of the interaction of respiration and fermentation, because aerobic fermentation is too labile and too dependent on external conditions. Of importance for the considerations that follow are only the two stable independent metabolic processes, respiration and *anaerobic* fermentation—respiration, which is measured by the oxygen consumption of cells that are saturated with oxygen, and fermentation, which is measured by the formation of lactic acid in the absence of oxygen.

Injuring of Respiration

Since the respiration of all cancer cells is damaged, our first question is, How can the respiration of body cells be injured? Of this damage to respiration, it can be said at the outset that it must be *irreversible*, since the respiration of cancer cells never returns to normal. Second, the injury to respiration must not be so great that the cells are killed, for then no cancer cells could result. If respiration is damaged when it forms too little adenosine triphosphate, it may be either that the oxygen consumption has been decreased or that, with undiminished oxygen consumption, the coupling between respiration and the formation of adenosine triphosphate has been broken, as was first pointed out by Feodor Lynen[2].

One method for the destruction of the respiration of body cells is removal of oxygen. If, for example, embryonal tissue is exposed to an oxygen deficiency for some hours and then is placed in oxygen again, 50 percent or more of the respiration is usually destroyed. The cause of this destruction of respiration is lack of energy. As a matter of fact, the cells need their respiratory energy to preserve their structure, and if respiration is inhibited, both structure and respiration disappear.

Another method for destroying respiration is to use respiratory poisons. From the standpoint of energy, this method comes to the same result as the first method. No matter whether oxygen is withdrawn from the cell or whether the oxygen is prevented from reacting by a poison, the result is the same in both cases—namely, impairment of respiration from lack of energy.

I may mention a few respiratory poisons. A strong, specific respiratory poison is arsenious acid, which, as every clinician knows, may produce cancer. Hydrogen sulfide and many of its derivatives are also strong, specific respiratory poisons. We know today that certain hydrogen sulfide derivatives, thiourea and thioacetamide, with which citrus fruit juices have been preserved in recent times, induce cancer of the liver and gall bladder in rats.

Urethane is a nonspecific respiratory poison. It inhibits respiration as a chemically indifferent narcotic, since it displaces metabolites from cell structures. In

recent years it has been recognized that subnarcotic doses of urethane cause lung cancer in mice in 100 percent of treatments. Urethane is particulary suitable as a carcinogen, because, in contrast to alcohol, it is not itself burned up on the respiring surfaces and, unlike ether or chloroform, it does not cytolyze the cells. Any narcotic that has these properties may cause cancer upon chronic administration in small doses.

The first notable experimental induction of cancer by oxygen deficiency was described by GOLDBLATT and CAMERON[3], who exposed heart fibroblasts in tissue culture to intermittent oxygen deficiency for long periods and finally obtained transplantable cancer cells, whereas in the control cultures that were maintained without oxygen deficiency, no cancer cells resulted. Clinical experiences along these lines are innumerable: the production of cancer by intermittent irritation of the outer skin and of the mucosa of internal organs, by the plugging of excretory ducts of glands, by cirrhoses of tissues, and so forth. In all these cases, the intermittent irritations lead to intermittent circulatory disturbances. Probably chronic intermittent oxygen deficiency plays a greater role in the formation of cancer in the body than does the chronic administration of respiratory poisons.

Any respiratory injury due to lack of energy, however, whether it is produced by oxygen deficiency or by respiratory poisons, must be cumulative, since it is irreversible. Frequent small doses of respiratory poisons are therefore more dangerous than a single large dose, where there is always the chance that the cells will be killed rather than that they will become carcinogenic.

Grana

If an injury of respiration is to produce cancer, this injury must, as already mentioned, be irreversible. We understand by this not only that the inhibition of respiration remains after removal of the respiratory poison but, even more, that the inhibition of respiration also continues through all the following cell divisions, for measurements of metabolism in transplanted tumors have shown that cancer cells cannot regain normal respiration, even in the course of many decades, once they have lost it.

This originally mysterious phenomenon has been explained by a discovery that comes from the early years of cell physiology[1]. When liver cells were cytolyzed by infusion of water and the cytolyzate was centrifuged, it was found that the greater part of the respiration sank to the bottom with the cell grana. It was also shown that the respiration of the centrifuged grana was inhibited by narcotics at concentrations affecting cell structures, from which it was concluded—already in 1914—that the respiring grana are not insoluble cell particles but *autonomous organisms*, a result that has been extended in recent years by the English botanist DARLINGTON[5] and particularly by MARK WOODS and H. G. DU BUY[6] of the National Cancer Institute in Bethesda, Md. WOODS and DU BUY have experimentally expanded our concepts concerning the self-perpetuating nature of mitochondrial elements (grana) and have demonstrated the hereditary role of extranuclear aberrant forms of these in the causation of neoplasia. The autonomy of the respiring grana, both biochemically and genetically, can hardly be doubted today.

If the principle *Omne granum e grano* is valid for the respiring grana, we understand why the respiration connected with the grana remains damaged when it has once been damaged; it is for the same reason that properties linked with genes remain damaged when the genes have been damaged.

Furthermore, the connection of respiration with the grana[7] also explains a carcinogenesis that I have not mentioned previously, the carcinogenesis by x-rays. RAJEWSKY and PAULY have recently shown that the respiration linked with the grana can be destroyed with strong doses of x-rays, while the small part of the respiration that takes place in the fluid protoplasm can be inhibited very little by irradiation. Carcinogenesis by x-rays is obviously nothing else than a destruction of respiration by elimination of the respiring grana.

It should also be mentioned here that grana, as GRAFFI has shown[8], fluoresce brightly if carcinogenic hydrocarbons are brought into their surroundings, because the grana accumulate the carcinogenic substances. Probably this accumulation is the explanation for the fact that carcinogenic hydrocarbons, although almost insoluble in water, can inhibit respiration and therefore have a carcinogenic effect.

Increase of Fermentation

When the respiration of body cells has been irreversibly damaged, cancer cells by no means immediately result. For cancer formation there is necessary not only an irreversible damaging of the respiration but also an increase in the fermentation—indeed, such an increase of the fermentation that the failure of respiration is compensated for energetically. But how does this increase of fermentation come about?

The most important fact in this field is that there is no physical or chemical agent with which the fermentation of cells in the body can be increased directly; for increasing fermentation, a long time and many cell divisions are always necessary. The temporal course of this increase of fermentation in carcinogenesis has been measured in many interesting works, among which I should like to make special mention of those of DEAN BURK[9].

BURK first cut out part of the liver of healthy rats and investigated the metabolism of the liver cells in the course of the ensuing regeneration, in which, as is well known, the liver grows more rapidly than a rapidly growing tumor. No increase of fermentation was found. Burk then fed rats for 200 days on butter yellow, whereupon liver carcinomas were produced, and he found that the fermentation slowly increased in the course of 200 days toward values characteristic of tumors.

The mysterious latency period of the production of cancer is, therefore, nothing more than the time in which the fermentation increases after a damaging of the respiration. This time differs in various animals; it is especially long in man and here often amounts to several decades, as can be determined in the cases in which the time of the respiratory damage is known—for example, in arsenic cancer and irradiation cancer.

The driving force of the increase of fermentation, however, is the energy deficiency under which the cells operate after destruction of their respiration, which forces the cells to replace the irretrievably lost respiration energy in some way. They

are able to do this by a selective process that makes use of the fermentation of the normal body cells. The more weakly fermenting body cells perish, but the more strongly fermenting ones remain alive, and this selective process continues until the respiratory failure is compensated for energetically by the increase in fermentation. Only then has a cancer cell resulted from the normal body cell.

Now we understand why the increase in fermentation takes such a long time and why it is possible only with the help of many cell divisions. We also understand why the latency period is different in rats and in man. Since the average fermentation of normal rat cells is much greater than the average fermentation of normal human cells, the selective process begins at a higher fermentation level in the rat and, hence, is completed more quickly than it is in man.

It follows from this that there would be no cancers if there were no fermentation of normal body cells, and hence we should like to know, naturally, from where the fermentation of the normal body cells stems and what its significance is in the body. Since, as Burk has shown, the fermentation remains almost zero in the regenerating liver growth, we must conclude that the fermentation of the body cells has nothing to do with normal growth. On the other hand, we have found that the fermentation of the body cells is greatest in the very earliest stages of embryonal development and that it then decreases gradually in the course of embryonal development. Under these conditions, it is obvious—since ontogeny is the repetition of phylogeny—that the fermentation of body cells is the inheritance of undifferentiated ancestors that have lived in the past at the expense of fermentation energy.

Structure and Energy

But why—and this is our last question—are the body cells dedifferentiated when their respiration energy is replaced by fermentation energy? At first, one would think that it is immaterial to the cells whether they obtain their energy from respiration or from fermentation, since the energy of both reactions is transformed into the energy of adenosine triphosphate, and yet adenosine triphosphate = adenosine triphosphate. This equation is certainly correct chemically and energetically, but it is incorrect morphologically, because, although respiration takes place for the most part in the structure of the grana, the fermentation enzymes are found for a greater part in the fluid protoplasm. The adenosine triphosphate synthesized by respiration therefore involves more structure than the adenosine triphosphate synthesized by fermentation. Thus, it is as if one reduced the same amount of silver on a photographic plate by the same amount of light, but in one case with diffused light and in the other with patterned light. In the first case, a diffuse blackening appears on the plate, but in the second case, a picture appears; however, the same thing happens chemically and energetically in both cases. Just as the one type of light energy involves more structure than the other type, the adenosine triphosphate energy involves more structure when it is formed by respiration than it does when it is formed by fermentation.

In any event, it is one of the fundamental facts of present-day biochemistry

that adenosine triphosphate can be synthesized in homogeneous solutions with crystallized fermentation enzymes, whereas so far no one has succeeded in synthesizing adenosine triphosphate in homogeneous solutions with dissolved respiratory enzymes, and the structure always goes with oxidative phosphorylation.

Moreover, it was known for a long time before the advent of crystallized fermentation enzymes and oxidative phosphorylation that fermentation—the energy-supplying reaction of the lower organisms—is morphologically inferior to respiration. Not even yeast, which is one of the lowest forms of life, can maintain its structure permanently by fermentation alone; it degenerates to bizarre forms. However, as PASTEUR showed, it is rejuvenated in a wonderful manner if it comes in contact with oxygen for a short time. "I should not be surprised," PASTEUR said in 1876[10] in the description of these experiments, "if there should arise in the mind of an attentive hearer a presentiment about the causes of those great mysteries of life which we conceal under the words youth and age of cells." Today, after 80 years, the explanation is as follows: the firmer connection of respiration with structure and the looser connection of fermentation with structure.

This, therefore, is the physicochemical explanation of the dedifferentiation of cancer cells. If the structure of yeast cannot be maintained by fermentation alone, one need not wonder that highly differentiated body cells lose their differentiation upon continuous replacement of their respiration with fermentation.

I would like at this point to draw attention to a consequence of practical importance. When one irradiates a tissue that contains cancer cells as well as normal cells, the respiration of the cancer cells, already too small, will decline further. If the respiration falls below a certain minimum that the cells need unconditionally, despite their increased fermentation, they die; whereas the normal cells, where respitation may be harmed by the same amount, will survive because, with a greater initial respiration, they will still possess a higher residual respiration after irradiation. This explains the selective killing action of x-rays on cancer cells. But still further: the descendants of the surviving normal cells may in the course of the latent period compensate the respiration decrease by fermentation increase and, thence, become cancer cells. Thus it happens that radiation which kills cancer cells can also at the same time produce cancer or that urethane, which kills cancer cells, can also at the same time produce cancer. Both events take place from harming respiration: the killing, by harming an *already* harmed respiration; the carcinogenesis by the harming of a *not yet* harmed respiration.

Maintenance Energy

When dedifferentiation of the body cells has occurred and cancer cells have thereby developed, there appears a phenomenon to which our attention has been called by the special living conditions of the ascites cancer cells. In extensively progressed ascites cancer of the mouse, the abdominal cavity contains so many cancer cells that the latter cannot utilize their full capacity to respire and ferment because of the lack of oxygen and sugar. Nevertheless, the cancer cells remain alive in the abdominal cavity, as the result of transplantation proves.

Recently we have confirmed this result by direct experiments in which we placed varying amounts of energy at the disposal of the ascites outside the body, *in vitro*, and then transplanted it. This investigation showed that all cancer cells were killed when no energy at all was supplied for 24 hours at 38°C but that one-fifth of the growth energy was sufficient to preserve the transplantability of the ascites. This result can also be expressed by saying that cancer cells require much less energy to keep them alive than they do for growth. In this they resemble other lower cells, such as yeast cells, which remain alive for a long time in densely packed packets—almost without respiration and fermentation.

In any case, the ability of cancer cells to survive with little energy, if they are not growing, will be of great importance for the behavior of the cancer cells in the body.

Sleeping Cancer Cells

Since the increase in fermentation in the development of cancer cells takes place gradually, there must be a transitional phase between normal body cells and fully formed cancer cells. Thus, for example, when fermentation has become so great that dedifferentiation has commenced, but not so great that the respiratory defect has been fully compensated for energetically by fermentation, we may have cells which indeed look like cancer cells but are still energetically insufficient. Such cells, which are clinically not cancer cells, have lately been found, not only in the prostate, but also in the lungs, kidney, and stomach of elderly persons. Such cells have been referred to as "sleeping cancer cells"[11, 12].

The sleeping cancer cells will possibly play a role in chemotherapy. From energy considerations, I could think that sleeping cancer cells could be killed more readily than growing cancer cells in the body and that the most suitable test objects for finding effective killing agents would be the sleeping cancer cells of skin—that is, precancerous skin.

Summary

Cancer cells originate from normal body cells in *two* phases. The first phase is the irreversible injuring of respiration. Just as there are many remote causes of plague—heat, insects, rats—but only one common cause, the plague bacillus, there are a great many remote causes of cancer—tar, rays, arsenic, pressure, urethane—but there is only one common cause into which all other causes of cancer merge, the irreversible injuring of respiration.

The irreversible injuring of respiration is followed, as the second phase of cancer formation, by a long struggle for existence by the injured cells to maintain their structure, in which a part of the cells perish from lack of energy, while another part succeed in replacing the irretrievable lost respiration energy by fermentation energy. Because of the morphological inferiority of fermentation energy, the highly differentiated body cells are converted by this into undifferentiated cells that grow wildly—the cancer cells.

To the thousands of quantitative experiments on which these results are based, I should like to add, as a further argument, the fact that there is no alternative

today. If the explanation of a vital process is its reduction to physics and chemistry, there is today no other explanation for the origin of cancer cells, either special or general. From this point of view, *mutation* and *carcinogenic agent* are not alternatives, but empty words, unless metabolically specified. Even more harmful in the struggle against cancer can be the continual discovery of miscellaneous cancer agents and cancer viruses, which, by obscuring the underlying phenomena, may hinder necessary preventive measures and thereby become responsible for cancercases.

Technical Considerations and Comments

Metabolism of the ascites cancer cells. The high fermentation of ascites cancer cells was discovered in Dahlem in 1951[12] and since then has been confirmed in many works[13, 14]. For best measurements, the ascites cells are not transferred to Ringer's solution but are maintained in their natural medium, ascites serum, which is adjusted physiologically at the beginning of the measurement by addition of glucose and bicarbonate. Because of the very large fermentation, it is necessary to dilute the ascites cells that are removed from the abdominal cavity rather considerably with ascites serum; otherwise the bicarbonate would be used up within a few minutes after addition of the glucose, and hence the fermentation would be brought to a standstill.

Under physiological conditions of pH and temperature, we find the following metabolic quotients in ascites serum[15]:

$$Q_{O_2} = -5 \text{ to } -10$$
$$Q_M{}^{O_2} = 25 \text{ to } 35$$
$$Q_M{}^{N_2} = 50 \text{ to } 70$$

where Q_{O_2} is the amount of oxygen in cubic millimeters that 1 milligram of tissue (dry weight) consumes per hour at 38°C with oxygen saturation, $Q_M{}^{O_2}$ is the amount of lactic acid in cubic millimeters that 1 milligram of tissue (dry weight) develops per hour at 38°C with oxygen saturation, and $Q_M{}^{N_2}$ is the amount of lactic acid in cubic millimeters that 1 milligram of tissue (dry weight) develops per hour at 38°C in the absence of oxygen.

Even higher fermentation quotients have been found in the United States with other strains of mouse ascites cancer cells[13, 14].

All calculations of the energy-production potential of cancer cells should now be based on the quotients of the ascites cancer cells, since these quotients are 2 or 3 times as large anaerobically as the values formerly found for the purest solid tumors. The quotients of the normal body cells, however, remain as they were found in Dahlem in the years from 1924 to 1929[16–19]. It is clear that the difference in metabolism between normal cells and cancer cells is much greater than it formerly appeared to be on the basis of measurements on solid tumors.

Utilizable energy of respiration and fermentation. Since the discovery of the oxidation reaction of fermentation in 1939[20], we have known the chemical reactions by which adenosine diphosphate is phosphorylated to adenosine triphosphate in fermentation; and since then we have found that 1 mole of fermentation lactic acid produces 1 mole of adenosine triphosphate (ATP).

The chemical reactions by which ATP is synthesized in respiration are still unknown, but it can be assumed, according to the existing measurements[21], that 7 moles of ATP can be formed when 1 mole of oxygen is consumed in respiration.

ATP quotients. If we multiply Q_{O_2} by 7 and $Q_M{}^{N_2}$ by 1, we obtain the number of cubic millimeters of ATP that 1 milligram of tissue (dry substance) can synthesize per hour (22,400 cubic millimeters = 1 millimole of ATP). We call these quotients $Q_{ATP}{}^{O_2}$ and $Q_{ATP}{}^{N_2}$, according to whether the ATP is formed by respiration or by fermentation, respectively.

Energy production of cancer cells and of normal body cells. In Table 1, the Q values of some normal body cells are contrasted with the Q values of our ascites cancer cells.

The cancer cells have about as much energy available as the normal body cells, but the ratio of the fermentation energy to the respiration energy is much greater in the cancer cells than it is in the normal cells.

Uncoupling of respiration. If a young rat embryo is transferred from the amniotic sac to Ringer's solution, the previously transparent embryo becomes opaque and soon appears coagulated[17]. At the same time, the connection between respiration and phosphorylation is broken; that is, although oxygen is still consumed and carbon dioxide is still developed, the energy of this combustion process is lost for life. If the metabolism quotients had previously been

$$Q_{O_2} = -15, Q_M{}^{O_2} = 0, Q_M{}^{N_2} = 25,$$
$$Q_{ATP}{}^{O_2} = 105, Q_{ATP}{}^{N_2} = 25$$

in the amniotic fluid, afterward, in Ringer's solution, they are

$$Q_{O_2} = -15, Q_M{}^{O_2} = 25, Q_M{}^{N_2} = 25,$$
$$Q_{ATP}{}^{O_2} = 0, Q_{ATP}{}^{N_2} = 25$$

Because of uncoupling of respiration and phosphorylation, the energy production of the embryo has fallen from $Q_{ATP}{}^{O_2} + Q_{ATP}{}^{N_2} = 130$, to 25; since the uncoupling is irreversible, the embryo dies in the Ringer's solution.

This example will show that the first phase of carcinogenesis, the irreversible damaging of respiration, need not be an actual decrease in the respiration quotient but merely an uncoupling of respiration, with undiminished over-all oxygen consumption. Ascites cancer cells, which owe their origin primarily to an uncoupling of respiration, could conceivably have the following metabolism quotients for example:

$$Q_{O_2} = -50, Q_M{}^{O_2} = 100, Q_M{}^{N_2} = 100,$$
$$Q_{ATP}{}^{O_2} = 0, Q_{ATP}{}^{N_2} = 100$$

which would mean that, despite great respiration, the usable energy production would be displaced completely toward the side of fermentation. One will now have to search for such cancer cells among the ascites cancer cells. Solid tumors—and especially solid spontaneous tumors—need no longer be subjected to such examinations today, of course, since the solid tumors are usually so impure histologically.

Aerobic fermentation. Aerobic fermentation is a property of all growing cancer cells, but aerobic fermentation without growth is property of damaged body cells—for

example, embryos that have been transferred from amniotic fluid to Ringer's solution. Since it is always easy to detect aerobic fermentation but generally difficult to detect growth, or lack thereof, of body cells, aerobic fermentation should not be used as a test for cancer cells, as I made clear in 1928[19].

Nevertheless, misuse is still made of aerobic fermentation. Thus, O'Connor[22] recently repeated our old experiments on the aerobic fermentation of the embryo that has been transferred into Ringer's solution, but he drew the conclusion that the growth of normal body cells is completed at the expense of the aerobic fermentation, even though it has long been established that the embryo does not ferment aerobically when it grows in the amniotic fluid.

Respiratory poisons. The specific respiration-inhibiting effect of arsenious acid and the irreversibility of its inhibitions were discovered in the first quantitative works on cell respiration[23, 24]. There is abundant literature on the carcinogenesis by arsenic, particularly on arsenic cancer after treatment of psoriasis and on the cancer of grape owners who spray their vineyards with arsenic. The specific respirationinhibiting effect of hydrogen sulfide has likewise been described by Negelein[25], and carcinogenesis by derivatives of hydrogen sulfide has been recently described by D. N. Gupta[26].

The irreversible inhibition of cell respiration by urethane was discovered early[27] as well as the fact that the urethane inhibition is more irreversible the higher the temperature. In sea urchin eggs, the effect of urethane was investigated, not only on the metabolism, but also on cell division in studies[28] from which the later urethane treatment of leukemia was developed. The physicochemical mechanism by which urethane and other indifferent narcotics inhibit cell respiration was cleared up in 1921[29]. Only much later did the carcinogenic effect of urethane become known. Actually, multiple lung adenomas can often be produced in 100 percent of the mice treated with small doses of urethane[30].

Oxygen deficiency. Short-period oxygen deficiency irreversibly destroys the respiration of embryos[16] without thereby inhibiting the anaerobic fermentation of the embryo. If such embryos are transplanted, teratomas are formed[31]. It has recently been reported that, in the development of the Alpine salamander, malformations occurred when the respiration was inhibited by hydrocyanic acid in the early stages of embryonal development[32].

Goldblatt and Cameron[3] reported that, in the *in vitro* culturing of fibroblasts, tumor cells appeared when the cultures were exposed to intermittent oyxgen deficiency for long periods, whereas, in the control cultures, no tumor cells appeared. In the discussion at the Stuttgart convention, Lettré cited against Goldblatt and Cameron the fact that another American tissue culturist, Earle, has occasionally obtained tumor cells from fibroblasts for reasons unknown to him and in an unreproduceable manner, but this objection does not seem weighty, and the latter part is untrue[33]. In any event, here is an area in which the methods of tissue culture could prove useful for cancer research. But warnings must be given against metabolism measurements in tissue cultures, if and when the tissue cultures are mixtures of growing and dying cells, especially under conditions of malnutrition.

Tabel 1. Contrast of the Q values of some normal body with cells the Q values of ascites cancer cells.

Cells	Q_{O_2}	Q_{MN_2}	Q_{ATPO_2}	Q_{ATPN_2}	$Q_{ATPO_2}+Q_{ATPN_2}$
Liver	— 15	1	105	1	106
Kidney	— 15	1	105	1	106
Embryo (very young)	— 15	25	105	25	130
Cancer	— 7	60	49	60	109

An example of the latter type of confusion is involved in the discussion by ALBERT FISCHER[34], especially in the chapter "Energy exchange of tissue cells cultivated *in vitro*."

Rous agent. If the Rous agent is inoculated into the chorion of chick embryos, tumors originate in the course of a few days—as rapidly as in the transplantation of cancer cells. The tumors formed are not chorion tumors but Rous sarcomas. The Rous agent, to which a particle weight of 150 million is ascribed at present, is therefore capable of transmitting the morphological properties of the Rous sarcoma; and whatever we call the Rous agent—"hereditary unit", cell fragment, microcell, or spore—the transmission of the Rous sarcoma by the Rous agent is, in any case, nothing more than a *transplantion* and is to be differentiated strictly from the production of a chicken sarcoma by methylcholanthrene, which is a neo-*formation* of a tumor from normal body cells and as such takes a long time.

The metabolism of the chicken sarcomas, whether produced by the Rous agent or by methlycholanthrene, is the same and does not differ in any way from the metabolism of the tumors of other animals[35]. In the first case, however, the fermentation potential has been transplanted with the Rous agent, whereas in the second case the fermentation has been intensified by selection from normal body cells under the action of the methylcholanthrene.

Addendum: in vitro Carcinogenesis and Metabolism

Since this paper was prepared, striking confirmation and extension of its main conclusions have been obtained from correlated metabolic and growth studies of two lines of tissue culture cancer cells of widely differing malignancy that were both derived from *one and the same* normal, tissue-culture cell[36]. The single cell was isolated some 5 years ago from a 97-day old parent culture of normal subcutaneous adipose tissue of a strain C3H/He mouse by SANFORD, LIKELY, and EARLE[33] of the National Cancer Institute. Up to the time that the singlecell isolation was made, no tumors developed when cells of the parent culture were injected into strain C3H/He mice. Injections of *in vitro* cells of the lines 1742 and 2049 (formerly labeled substrains VII and III, respectively) first produced tumors in normal C3H/He mice after the 12th and 19th *in vitro* transplant generations, respectively; after $1^1/_2$ years, the percentage production of sarcomas was 63 and 0 percent, respectively; and after 3 years, it was 97 and 1 percent, respectively, with correspondingly marked differences in length of induction period. Despite such gross differences

in "malignancy" *in vivo*, the rates of growth of the two lines of cells maintained continuously *in vitro* have remained nearly identical and relatively rapid. Nevertheless, the metabolism of the two lines of cancer cells, whose malignancy was developed *in vitro*, has been found by WOODS, HUNTER, HOBBY, and BURK to parallel strikingly the differences in malignancy observed *in vivo*, in a manner in harmony with the predications and predictions of this article.

The metabolic values were measured following direct transfer of the liquid cultures form the growth flasks into manometric vessels, without notable alteration of environmental temperature, pH, or medium composition (horse serum, chick embryo extract, glucose, bicarbonate, balanced saline). The values obtained thus accurately represent the metabolism of growing, adequately nourished, pure lines of healthy cancer cells free of admixture with any other tissue cell type. The anaerobic glycolysis of the high-malignancy line 1742 was $Q_M{}^{N_2} = 60$ to 80, which is virtually maximum for any and all cancer cells previously reported, including ascites cells[12–14]. The anaerobic glycolysis of the low-malignancy line was, however, only one-third as great, $Q_M{}^{N_2} = 20$ to 30. The average aerobic glycolysis values for the two lines were in the same order, $Q_M{}^{O_2} = 30$ and 10, respectively, but of lower magnitude because of the usual, pronounced Pasteur effect, greater in line 1742 than in line 2049 ($Q_M{}^{N_2}$—$Q_M{}^{O_2}$ = about 40 and 15). On the other hand, the rates of oxygen consumption were in the converse order, being smaller in line 1742 ($Q_{O_2} = 5$ to 10) than in line 2049 ($Q_{O_2} = 10$ to 15), corresponding to a greater degree of respiratory defect in line 1742. The respiratory defect in both lines was further delineated by the finding of little or no increase in respiration after the addition of succinate to either line of cells, in contrast to the considerable increases obtained with virtually all normal tissues[9]; and the respiratory increase with paraphenylenediamine was likewise relatively low, compared with normal tissue responses.

A further notable difference between the two cell lines was the very much lower inhibition of glycolysis by podophyllin materials (anti-insulin potentiators) observed with line 1742 compared with line 2049 (for example, 10 and 70 percent, respectively, at a suitably low concentration). This result would be expected on the basis of the much greater loss of anti-insulin hormonal restraint of glucose metabolism, at the hexokinase phosphorylating level, as the degree of malignancy is increased, just as was reported for a spectrum of solid tumors[14].

Finally, the high-malignancy line 1742 cells have been found by A. L. SCHADE to contain 3 times as much aldolase as the low-malignancy line 2049 cells (11, — 300 versus 3700 WARBURG activity units per milliliter of packed cells extracted), and about 2 times as much α-glycero-phosphate dehydrogenase [2600 versus 1400 Schade activity units[13] per mililiter of packed cells extracted]. The potential significance of these indicated enzymic differences in relation to the parallel glycolytic differences, measured with aliquots of the same cell cultures, is evident, and may well be connected with the corresponding hexokinase system differences.

The new metabolic data on the two remarkably contrasting lines of cancer cells, which originated from a single, individual cell and have been maintained exclusively *in vitro* over a period of years, epitomize and prove finally the main conclusions of

this article, which are based on decades of research. Such metabolic analyses provide promise of a powerful tool for diagnosis of malignancy in the ever-increasing variety of tissue-culture lines now becoming available in this rapidly expanding biological and medical field, where characterization of malignancy by conventional methods (animal inoculation or otherwise) may be difficult or impracticable. This metabolic tool should be especially important in connection with the use of tissue cultures for the evaluation of chemotherapeutic agents or other control procedures.

References and Notes

1 The transplantable ascites cancer was discovered by H. Loewenthal and G. Jahn [Z. Krebsforsch. 37 (1932), 439]. G. Klein (Stockholm) expanded our knowledge about the physiology and morphology of the ascites tumors and showed their great advantages as experimental material. [Exptl. Cell Research 2 (1951), 518].

2 Lynen, F., Naturwissenschaften 30 (1942), 398; Ann. Chem. Justus Liebig 573 (1951), 60.

3 Goldblatt, H., and Cameron, G., J. Exptl. Med. 97 (1953), 525.

4 Warburg, O., Pflügers Arch. ges. Physiol. 154 (1913), 599; 158 (1914), 19.

5 Darlington, C. D., Brit. J. Cancer 2 (1948), 118.

6 Woods, M. W., et al., J. Natl. Cancer Inst. 11 (1951), 1105; 9 (1949), 311; 9 (1949), 325; 16 (1955), 351. Science 102 (1945), 591; 111 (1950), 572. AAAS Research Conf. on Cancer (Science Press, Lancaster, Pa., 1945), p. 162. J. Wash. Acad. Sci. 42 (1952), 169. Pigment Cell Growth, M. Gordon, Ed. (Academic Press, New York, 1953), p. 335. Biochem. et Biophys. Acta 12 (1953), 329. Proc. Am. Assoc. Cancer Research 1 (1954), 7. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83 (1953), 62. Phytopathology 33 (1943), 637, 766; 36 (1946), 472; 31 (1941), 978; 32 (1942), 288. Am. J. Botany 33 (1946), 12a; 38 (1951), 419.

7 A compilation of American works on the metabolism of the grana, in which my results of 1914 (4) have been confirmed, is given by G. Hogeboom, W. Schneider and M. Striebich in Cancer Research [13 (1953), 617]. In a very special case—nucleated red blood cells of birds, which contain no grana or only poorly visible ones—the entire respiration can be centrifuged off with the cell nuclei [O. Warburg, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 70 (1913), 413].

8 Graffi, A., Z. Krebsforsch. 49 (1939), 477.

9 Burk, D., Symposium on Respiratory Enzymes (Univ. of Wisconsin Press, Madison, 1942), p. 235; J. G. Kidd, R. J. Winzler, D. Burk, Cancer Research 4 (1944), 547.

10 Pasteur, L., Études sur la Bière (Masson, Paris, 1876), p. 240.

11 Craigie, J., J. Pathol. Bacteriol. 63 (1951), 177; 64 (1952), 251. H. Hamperl, Verhandl. Deut. Ges. Pathol. 35 (1951), 29.

12 Warburg, O., and Hiepler, E., Z. Naturforsch. 7b (1952), 193.

13 Schade, A. L., Biochim. et Biophys. Acta 12 (1953), 163.

14 Woods, M., Hunter, J., Burk, D., J. Natl. Cancer Inst. 16 (1955), 351.

15 I am indebted to Georg Klein of the Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, for his Ehrlich strain of mouse ascites cells.

16 Warburg, O., Posener, K., Negelein, E., Biochem. Z. 152 (1924), 309.

17 Negelein, E., ibid. 165 (1925), 122.

18 Warburg, O., et al., ibid. 189 (1927), 114, 175, 242; 193 (1928), 315; 197 (1928), 175; 204 (1929), 475, 479.

19 ibid. 204 (1929), 482.

20 et al., ibid. 303 (1939), 40, 132.

21 Krebs, H. A., et al., Biochem. J. London 54 (1953), 107.

22 O'Connor, R. J., Brit. J. Exptl. Pathol. 31 (1950), 390.

23 Warburg, O., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 70 (1911), 413; M. Onaka, ibid. 70 (1911), 433; 71 (1911), 193.

24 Dresel, K., Biochem. Z. 178 (1926), 70.

25 Negelein, E., ibid. 165 (1925), 203.

26 Gupta, D. N., Nature 175 (1955), 257.

27 Usui, R., Pflüger's Arch. ges. Physiol. 147 (1912), 100.

28 Warburg, O., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 66 (1910), 305; 70 (1911), 413.

29 Biochem. 119 (1921), 134.

30 Larsen, C. D., J. Natl. Cancer Inst. 8 (1947), 63.

31 Warburg, O., Biochem. Z. 228 (1930), 257.

32 Tiedemann, H., and Tiedemann, H., Z. Naturforsch. 9b (1954), 371.

33 Sanford, K. K., Likely, G. D., Earle, W. R., J. Natl. Cancer Inst. 15 (1954), 215.

34 Fischer, A., Biology of Tissue Culture (Copenhagen, Denmark, 1946).

35 Warburg, O., Biochem. Z. 160 (1925), 307; D. Burk et al., J. Natl. Cancer Inst. 2 (1941), 201.

36 This summary of studies of various collaborating groups of investigators was prepared by Dean Burk at Professor Warburg's request.

36 On Respiratory Impairment in Cancer Cells*

By Sidney Weinhouse

Some years ago Otto Warburg[1] enunciated a theory of cancer which, briefly summarized proposed that cancer originates when a nonneoplastic cell adopts an anaerobic metabolism as a means of survival after injury to its respiratory system. According to Warburg, the tumor is initiated by a damaged respiration, which persists as a characteristic feature of the neoplastic condition. In a recent paper, entitled "On the origin of cancer cells," originally published in German[2] and then translated into English[3], Warburg reiterates this hypothesis and claims further support for it on the basis of experiments with ascites tumor cells. I recognize the great debt that biochemists owe this illustrious investigator and regret the necessity of taking issue with his basic biochemical premise, namely, that cancer cells have an impaired respiration.

In a comprehensive review of this subject in 1939, Burk[4] first pointed out the essentially fallacious reasoning behind this hypothesis. More recently, Schmidt[5] and I[6] reviewed this topic independently in the light of modern findings and concluded similarly that there is no sound experimental basis for the belief that oxidative metabolism in tumors is impaired. It is recognized by all, including Warburg, that despite their high glycolysis, oxygen consumption is not quantitavely diminished; by and large, a representative group of tumors absorb oxygen about as rapidly as a comparable group of nonneoplastic tissues (see, for example, Burk's extensive tables[4]). An early statement by Warburg, illustrative of his views concerning the relationship between the high aerobic and anaerobic glycolysis of tumor cells and their oxygen consumption, is the following (1, pp. 139—141).

"We determined the Meyerhof quotient for carcinoma tissue, lactic acid bacteria, embryonic tissue and a number of other glycolyzing tissues, and as a rule obtained the same mean values as Meyerhof. As a rule 1 mol. of breathed oxygen, just as in muscle, causes the disappearance of 1—2 mol. lactic acid. This result . . .

---

* Republished from Science 124 (1956): 267 by permission.

Zusatz 1961. Die anaerobe Gärung der Asciteskrebszellen der Maus hat in Serum den mittleren Wert $Q_M^{N2} = 70$, der Meyerhofquotient der embryonalen Zellen in Serum hat einen Mittelwert von 1,5. Wären die Krebszellen embryonale Zellen, so müßte die Atmung Q_{O_2} der Krebszellen den Wert 70/1,5 = 47 haben, während wir im Mittel $Q_{O_2} = 7$ finden. Dies meinen wir, wenn wir sagen, daß die Atmung der Krebszellen zu klein ist, obwohl wir wissen, daß z. B. Bindegewebe eine so niedrige Atmung wie $Q_{O_2} = 1$ hat. Im übrigen ist unser Hauptergebnis, die fakulatative Anaerobiose der Krebszellen im Körper, nicht durch eine ununterbrochene „reiteration" erhalten worden, sondern durch eine ununterbrochene Folge von neuen Methoden und neuen Experimenten. Wer ein auf diese Weise errichtetes Gebäude angreift, riskiert, daß er die Wahrheit angreift, eine wenig adaequate Tätigkeit für einen Wissenschaftler.

proves that the influence of the respiration on the cleavage metabolism in the carcinoma-cell is normal . . . Although in the tumor every oxygen molecule breathed is just as effective as in muscle—the Meyerhof quotient is equal in the two cases—yet the respiration does not cause the glycolysis to disappear. The respiration of the carcinoma tissue is too small in comparison with its glycolytic power."

Thus, according to WARBURG, the Meyerhof quotient (a quantitative expression of the Pasteur effect) is normal in carcinoma, and oxygen consumption is also not quantitatively diminished; but respiration is disturbed, because glycolysis persists in oxygen. As I pointed out earlier (6, p. 276), I believe it would be more accurate to state that anaerobic glycolysis is so high in tumors that a normal respiration and a normal Pasteur effect are incapable of eliminating it.

Although WARBURG still states categorically that ". . . the respiration of all cancer cells is damaged . . ." (3, p. 309), he has given no clearer justification now for this view than he did 26 years ago. In Table 1[3], he shows that whereas liver, kidney, and embryo have Q_{O_2}'s of — 15, the ascites tumor has a Q_{O_2} of — 7. On these grounds he concludes that the tumor cannot utilize sufficient oxygen for its needs and thus requires fermentative energy. On the assumption that each mole of lactic acid formed from glucose yields 1 mole of ATP, and each mole of oxygen consumed gives rise to 7 moles of ATP, he calculates that the tumor obtains more than half of its potential phosphate bond energy by glycolysis, whereas the three noncancer tissues obtain theirs mainly by respiration. Accepting these results at their face value, it is still necessary to ask why some normal tissues manage to survive without glycolysis with Q_{O_2}'s of — 3 to — 6; also, why some tumors glycolyze highly with Q_{O_2}'s as high as — 10 to —20 (4, pp. 438—441)? It is also pertinent to ask why certain nonneoplastic tissues, with moderate to high oxygen uptakes—for example, brain, retina, kidney medulla, and intestinal mucosa—glycolyze as highly as many tumors[7]? It is evident that all tumors produce large amounts of lactic acid, but so do many noncancer tissues; and just as noncancer tissues display a wide diversity in oxygen uptake, so do tumors.

Although it is unintentional, I am sure, Table 1[3] gives misleading impressions that the respiratory and glycolytic activities are constant and characteristic for a single tissue, and that all tissues produce essentially the same amounts of phosphate bond energy. Actually, tissue even from a single organ will vary considerably in Q_{O_2} from one animal to another. In our experience, rat liver slices display Q_{O_2}'s ranging from —6 to —12 (usually about —7), and rat kidney cortex from —15 to —25. Biochemists are confronted with a wide variety of tissues of the most diverse respiratory behavior. Our present state of knowledge does not allow any categorical statements about what represents a proper respiratory activity for maintenance of either a normal or a cancer cell; nor can we state what is an optimal enzyme activity for a particular cell function.

Perhaps the most damaging evidence against the WARBURG hypothesis has been obtained in isotope tracer studies (6, pp. 303 ff). The results of such studies leave no doubt of the ability of miscellaneous tumors to convert glucose (and fatty acids) to carbon dioxide at rates similar in magnitude to that of nonneoplastic tissues[5, 6]. It is difficult to imagine a type of respiratory disturbance not involving either a

diminution in oxygen consumption or a loss in the ability to convert glucose and fatty acids to CO_2.

WARBURG suggests in the present paper that perhaps the respiratory impairment may involve an inability to couple oxidation with phosphorylation. Here again, the available evidence does not support such a concept. Effects of inhibitors such as fluoride ion or dinitrophenol are similar in neoplastic and nonneoplastic tissues[8] and data of other investigators (6, p. 321) have given no indication that oxidative phosphorylation occurs in tumor mitochondria in a manner different from that in their noncancerous counterparts.

Another pertinent illustration of the inadequacy of the WARBURG concept is that it fails to consider that a large part of the respiration of cancer cells may be due to fatty acid oxidation. Although it seems fairly certain now that animal tissues generally, including the neoplastic, use fatty acids as a metabolic fuel, nowhere in WARBURG's writings is there any consideration of the possible role played by fatty acids in the respiration of cells.

Another weakness of the WARBURG hypothesis is that it does not fit in with what we have learned in recent years of chemical mechanisms of glycolysis and respiration. Again, WARBURG states, "We need to know no more of respiration and fermentation here than that they are energy-producing reactions . . ." (3, p. 309). This attitude may have been justified 25 years ago when little was known of their chemical nature. At present we recognize that they are not "independent metabolic processes" but are intimately related. To assume that respiration and glycolysis are separately activated, alternate means of cellular energy production, it is indeed necessary to ignore all that has been learned of their chemical mechanisms.

According to our present conceptions, the major pathway of oxidation of glucose to carbon dioxide in most animal cells, whether normal or neoplastic, involves its conversion to pyruvic acid by way of the Embden-Meyerhof process, oxidative decarboxylation of pyruvic acid to acetyl coenzyme A, and condensation of the latter with oxaloacetic acid to enter the citric acid cycle. Down to the pyruvic acid stage, respiration and fermentation follow a common pathway. The extent to which pyruvic acid, a common intermediary in both respiration and glycolysis, competes for electrons held by the pyridine nucleotides with those factors that transport electrons to oxygen—namely, the flavoproteins and cytochromes—should be a crucial factor in determining the degree of aerobic glycolysis.

If there is a disturbance in respiration that leads to an accumulation of lactic acid, it can occur only at or beyond the pyruvic acid stage and must be due either to some aberration in carbon transport through the citric acid cycle or to some "bottleneck" in electron transport. Many enzymatic and isotope tracer studies have fully established that the citric acid cycle operates in tumors (6, pp. 311 ff). Although cytochromes are reportedly low in tumors (9, pp. 404 ff), as are also some of the B vitamins involved in electron transport (9, p. 408), the generally unimpaired oxygen consumption already referred to clearly indicates that electrons reach oxygen about as readily in tumors as in other tissues. Thus, the available evidence indicates to me that high glycolysis occurs, *despite* quantitatively and qualitatively normal occurrence of carbon and electron transport. This can mean only that

glucose catabolism is so rapid in tumors that the normal channels for disposal of pyruvic acid are overloaded. Many possibilities exist for explaining this high glucose catabolism, which do not involve disturbances in respiration. My colleagues and I are now attempting to unravel the multiplicity of factors concerned with lactic acid production in the intact cell.

I do not wish to minimize the significance of the high aerobic and anaerobic glycolysis of tumor tissue. It is conceivable that glycolytic activity, though not resulting from a faulty respiration, may play a special role in the neoplastic process. Data are available from the field of lipid metabolism, for example, which suggest that some phase of glucose catabolism in liver is coupled with fatty acid synthesis[10]. The close association of lactic acid production with the neoplastic process, and with growth in general, makes this phenomenon a worthy subject of study.

WARBURG states (3, p. 309), "We now understand the chemical mechanism of respiration and fermentation almost completely . . ." We have, indeed, learned a great deal of what can happen in cells, and much of this can be credited to WARBURG, who has played a large part in expanding our biochemical frontiers. The fact that progress has been so great in the past must make us aware, however, that future progress will also be great, and that our present knowledge is still primitive. Certainly we have much to learn before we can feel we understand the mechanisms that underlie the utilization of metabolic fuels for functional activities of cells.

References and Notes

1 WARBURG, O., Metabolism of Tumors, translated by F. DICKENS (Constable, London, 1930).
2 Naturwissenschaften 402 (1955), 401.
3 Science 123 (1956), 309.
4 BURK, D., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 7 (1939), 420.
5 SCHMIDT, C. G., Klin. Wochschr. 33 (1955), 409.
6 WEINHOUSE, S., Advances in Cancer Research 3 (1955), 269. To save space, original references are not cited, but references are given to the appropriate page of the writer's review. This may be consulted for a more detailed discussion of this subject.
7 DICKENS, F., The Enzymes (Academic, New York, 1955), vol. II, pt. 1, p. 624.
8 WENNER, C. E., and WEINHOUSE, S., Cancer Research 15 (1955), 497.
9 GREENSTEIN, J. P., Biochemistry of Cancer (Academic, New York, 1954).
10 GURIN, S., Fat Metabolism (Johns Hopkins Press, Baltimore, Md., 1954), p. 138.

36a On Respiratory Impairment in Cancer Cells*

By Dean Burk und Arthur L. Schade

A mass of experimental data published during the past 33 years has established the phenomenon of a metabolism characteristic of living cancer cells, including high anaerobic and aerobic glycolysis (formation of lactic acid from glucose) and an impaired respiration[1,2]. The impaired respiration may involve any combination—usually at least three—of the following experimental quantities readily measurable under appropriate conditions: (i) a high ratio of glycolysis to respiration; (ii) a low absolute value for oxygen consumption (Q_{O_2}); (iii) an inefficient or uncoupled respiration; or (iv) a low paraphenylenediamine (succinate) oxidative response[3]. This list could be expanded.

Respiratory impairment in living cancer cells, first discovered by Otto Warburg in 1923, is an experimental fact, and not, as described by Weinhouse[4,5] a hypothesis based on "essentially fallacious reasoning". Statements of Weinhouse indicating that the author of "Burk's extensive tables" has at any time ever denied the factual existence of an impaired respiration in cancer cells are categorically untrue.

The overwhelming evidence for the occurrence of various forms of respiratory impairment in neoplastic cells, available in some 1000 experimental papers, but denied by Weinhouse, obviously cannot be recapitulated in this note. It is, however, possible to outline here decisive errors in the most tangible support offered by Weinhouse for his central, underlying view that "by and large, a representative group of tumors absorb oxygen about as rapidly as a comparable group of nonneoplastic tissues . . . oxygen consumption is not quantitavely diminished"[6]. Curiously, this longdiscarded but now exhumed view, which specifically denies a low Q_{O_2} in most cancer cells (impairment ii), is alleged to derive its main support from "Burk's extensive tables"[7]. Weinhouse [4, (p. 271)] has selectively condensed parts of these extensive tables, on some incompletely defined basis, and arrived at the following average tissue slice Q_{O_2} values for three groups of tissues, each of which has a wide spread of individual values: 15 types of malignant tumors, —11.8; seven growing tissues (three types), —9.7; 14 nongrowing tissue types, —9.3. In short, by these statistics, the tumors would *appear* to have an average ("by and large") respiration that is not lower, but even higher, than that of either the growing or nongrowing tissues selected as "comparable".

But such average Q_{O_2} values are meaningless as they stand, both statistically and otherwise. They have not been adjusted for important species differences among the three groups, for medium effects, for cellular impurity in the tumors (normal tissues, ordinarily being 100 percent nonneoplastic, need no such adjustment), for differences of technique among the different investigators cited, and so forth. A remarkable error is Weinhouse's inclusion, in the already small group of growing

---

* Republished from Science 124 (1956): 270 by permission.

tissues, of certain tissues that had first been severely predamaged by treatment with cyanide and anaerobiosis (!), thus lowering notably the calculated average Q_{O_2} for this group.

WEINHOUSE's statistical approach to the problem of possible Q_{O_2} impairment in cancer cells requires the use of the foregoing adjustments just as surely as cancer mortality and morbidity statistics require adjustment, in the absence of complete and perfect data. The types of adjustments listed all tend, without exception, to raise the Q_{O_2} values of normal tissues relative to tumor tissues, with the end result that, as one approaches truly physiological comparisons, one obtains average Q_{O_2} values for normal growing and nongrowing tissues that are "by and large" two to three times higher than those for tumors, with reduction in spread of individual values.

The first two types of adjustment listed are probably the most important quantitatively and will be briefly discussed by way of illustration. It is well established from the data extensively summarized and formalized, for example, by KREBS[8] and ADOLPH[9], that tissue respiratory rate, basal heat production, ventilation rate, and a host of other vital properties are marked, linear log-log functions of species body weight. The group of normal tissues selected by WEINHOUSE were from the rat, rabbit, dog, and man, but none from mice; the tumor tissue types selected were preponderantly from mice, the normal tissues of which have average rates of respiration and basal heat production far above those of the larger species, the basal heat productions being of the rough relative order 160, 100, 60, 35, and 25 in mice, rat, rabbit, dog, and man, respectively. Any reasonable (but imperative!) adjustment of average respiratory rate for species difference alone would place the tumor group well below that of the normal group, with an adjusted average Q_{O_2} value of —6 to —7 (instead of —11.8,[10]. This value agrees with the grand average value that one obtains directly from all 30 widely varying types of malignant, nonmouse tumors (rat, chicken, man) listed in "BURK's extensive tables" VII and VIII[7], many of which were excluded from, or improperly weighted in, the selected and condensed summary prepared by WEINHOUSE without due regard to the effect of species. This single error in WEINHOUSE's statistics, by itself, reverses the order of average Q_{O_2} values among his three groups, so that nongrowing > growing > tumor.

The second factor, of equal quantitative importance in tending to widen further the relative difference between normal and tumor tissues, is that in virtually all of the experiments selected by WEINHOUSE from BURK's tables, simple saline media were employed, instead of sera or similar body fluids that are much more physiological and therefore much more pertinent for the solution of the problem at hand. Extensive modern studies show, even better than earlier studies, that the use of sera instead of saline media increases the average Q_{O_2} values of normal tissues much more than that of tumors—by a relative factor up to 2 and more. This differential response is due partly, though not wholly, to the greater response of normal tissue to respiratory substrates occurring naturally in sera but not added to the early saline media employed in the experiments selected by WEINHOUSE. This differential response finds equivalent and additional expression in the relatively small succin-

ate oxidative response shown by tumor tissue [impairment type iv; compare KIDD *et al.*[3] and WEINHOUSE [4, p. 302]].

It is obvious that in the hands of WEINHOUSE the statistical approach has led to gross error in final conclusion. This erroneous conclusion has been woven into his papers[4, 5] extensively and affects still other conclusions based on it, leading to general confusion not confined to his own papers[11].

The error concerning species adjustment that WEINHOUSE has introduced into his consideration of "BURK's extensive tables" enters with equal force into various of his conclusions concerning his own experimental data[4, 5] obtained with isotopically marked substrates, where again results with miscellaneous rat and mouse materials are often mixed indiscriminately; space, however, does not permit tabular detailing of his propagation of errors in this direction. Suffice it to say, his own data reported on Q_{O_2} (sketchy, but republished verbatim many times) show lower average species unadjusted Q_{O_2} values for the tumors (—5.3 for 19 determinations) than for the normal tissues (—9.5 for 19 determinations) in saline-substrate (nonserum) media. Unfortunately, the mouse data contain only one normal tissue (liver) and several tumor types, whereas the rat data contain only one tumor type (hepatoma) and several normal tissues. If more normal mouse-tissue types and more rat-tumor types had been available for proper species adjustment, the adjusted values (for either species) would have been even wider apart than —5.3 and —9.5, since the Q_{O_2} of hepatoma is relatively high among tumors and the Q_{O_2} of normal liver tissue is relatively low among highly functional normal tissues.

When, in more extensive experimentation, C^{14}-marked substrates were tested (glucose, lactate, and 2,4-acetoacetate), there was in general a relatively much greater aerobic production of $C^{14}O_2$ by the normal tissue groups than by the tumor groups employed. On an absolute basis, $Q_{C^{14}O_2}$ in the tumors rarely exceeded 2 ("O.C." = 89), and were ordinarily well below 1; but normal tissues ranged up to $Q_{C^{14}O_2} = 4$ and more, notably with lactate, an important constituent of sera. These isotope tracer studies of WEINHOUSE show that fatty acids and a wide variety of exogenous substrates may be oxidized to carbon dioxide by a miscellany of rat and mouse tumors, but only at quite small initial rates that were on the average lower than the average of initial rates shown by the highly functional normal rat and mouse tissues tested. Such studies largely confirm, albeit with superior quantitative finesse, widely accepted conclusions reached decades ago by investigators who had employed time-honored kinetic, substrate-addition, and respiratory quotient methods.

G. N. LEWIS[12] has said, "It is a common fault of mankind to refuse to recognize the extence of a phenomenon unless some mechanism has been devised." Much of the general confusion[11, 13] evident in the discussion advanced by WEINHOUSE also derives from his failure to distinguish between various over-all phenomena of respiratory impairment, on the one hand, and detailed mechanisms thereof, on the other. In his own experimental work he has looked for respiratory impairment among details of biochemical respiratory mechanisms, following well-worn channels of possible aberrancy—for example, enzyme content[14], citric acid cycle,

exogenous substrate oxydation, localized "bottlenecks" in electron transport, pyruvate shunt, hexosemonophosphate shunt, and fluoride and dinitrophenol inhibitions. The results obtained by him, even with isotopic tracers, have in no way contra-indicated the over-all phenomena of respiratory impairment, and have indeed provided some valuable supporting evidence. In any event, such conventional and assuredly worthwhile studies are, regardless of outcome, no more essential to experimental recognition of the overall phenomena of respiratory impairment in living cancer cells than is knowledge of the ultimate physical mechanism of gravitation essential to experimental recognition of the square law of gravitation. In the words of ISAAC NEWTON[15], "the main Business of Natural Philosophy is to argue from Phaenomena . . . we must learn from the Phaenomena of Nature what are the Laws and Properties of the Attraction before we enquire the Cause by which the Attraction is perform'd."

It is a tribute to the genius of OTTO WARBURG that he discovered the impaired Q_{O_2} of cancers more than 30 years ago with the now absolete methods and relatively poor (mixed) cancer materials then available, and under the handicap of the statistical approach. It is a further tribute that in recent years WARBURG has been the first to appreciate and capitalize on the importance of the use of pure cancer cells (for example, ascites and tissue culture cells) for final decision on the relative status of Q_{O_2} in cancer cells. It should never be forgotten, however, that in the characterization of cancer metabolism, once developed following carcinogenesis, he has always (1924—1956) regarded the invariably high ratio of fermentation to respiration (impairment type i) as of much greater significance than the usually low Q_{O_2} (impairment type ii).

On the basis of impairment type i, and as a confirmatory qualitative demonstration thereof, the following simple manometric test has been devised[16] that permits investigators to distinguish cancer cells from virtually all normal body cells, growing or nongrowing. The cells under test are placed in a manometric vessel of any convenient size. The vessel is filled to one-third to one-half of its volume with physiological serum or other equivalent body fluid (5 percent CO_2 in O_2 or air as appropriate, slight alkalinity, adequate glucose and bicarbonate). The volume of cells is of the order of 1/300 the volume of serum. Cancer cells cause the manometer to register a steady and notable increase in pressure with time (minutes to hours), whereas normal (uninjured) body cells cause a negative (or $\sim$ zero) change in pressure with time. The few—if any—exceptions extant are only apparent, or are readily ruled out on other bases; thus, use of nonphysiological media (for example, unfortified saline) may vitiate the test for normal cells, and omission of the carbohydrate glucose certainly will for cancer cells.

This test can be made quantitative, but in the simple form just outlined it possesses the advantage of being qualitative. It offers a distinction between neoplastic and normal cells that is as qualitative as "plus versus minus" or "up versus down," and that is observable in terms of mere pressure change—that is, directional movement of the manometric fluid. The quantitative metabolic basis for the observed qualitative manometry is completely understood. Thus, the sign and magnitude of the pressure change can be expressed as an exact mathematical function of

the ratio of the absolute magnitude of aerobic glycolysis to the absolute magnitude of respiration for any given conditions of experimental arrangement[17].

It is hoped that this simple test may prove useful or definitive in studies of many tissues or cells of questionable malignancy—for example, in tissue cultures of originally normal cells that are undergoing or have undergone carcinogenesis, as well as numerous *in vivo* instances. In any event, the proposed test is a *post facto* epitomization of three decades of experimental protocols in the literature that are in harmony with the concepts recapitulated in this communication on respiratory impairment in "THE metabolism of THE cancer cell."

References and Notes

1 WARBURG, O., Biochem. Z. 142 (1923), 317; Metabolism of Tumors, translated by F. DICKENS (Constable, London, 1930); Science 123 (1956), 309; Science, this issue.

2 Various words expressing "impaired" respiration have been employed by various writers, all, however, to much the same gross end result, semantics aside: damaged, destroyed, defective, diminished, disturbed, eliminated, harmed, inadequate, inhibited, injured, insufficient, limited, restrained, uncoupled, weakened, eingeschränkt, entkoppelt, gehemmt, geschädigt, insuffizient, unzureichend, vergiftet, vermindert, zerstört, zugrunde gegangen, and zurückgegangen. In any event, the irreversible respiratory limitation referred to in cancer cells is always partial, never total; otherwise, their life and continued growth would totally cease, so far as is known.

3 KIDD, J. G., WINZLER, R. J., BURK, D., Cancer Research 4 (1944), 457.

4 WEINHOUSE, S., Advances in Cancer Research 3 (1955), 269; Science, this issue.

5 WEINHOUSE, S., Antimetabolites and Cancer (AAAS, Washington, D.C., 1955), p. 1; Cancer Research 11 (1951), 585, 845.

6 WEINHOUSE'S frequently reiterated statement that this view held by him has now come to be held also by WARBURG is categorically incorrect, as simple inspection of the two recent articles by the latter in Science (1) will suffice to show, in addition to many others that date back to 1924. Questioned directly regarding the accuracy of this footnote, WARBURG has provided written, emphatic confirmation (July 1956).

7 BURK, D., Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. 7 (1939), 437, 441.

8 KREBS, H. A., Metabolism and Function (Elsevier, Amsterdam, 1950), p. 249.

9 ADOLPH, E. F., Science 109 (1949), 579.

10 It is important to note that the Qo_2 values for the mouse tumors of CRABTREE and MURPHY and HAWKINS (1925—29), selected by WEINHOUSE from BURK's tables and averaging —13.9 for ten types, are, in fact, exceptionally high when compared with most values for mouse tumors obtained during the last 25 years by others using improved manometric methods. In the work of DICKENS and SIMER in 1930—31 (also cited in BURK's tables) the Qo_2 values for the five mouse tumor types reported on averaged only —7.1! Three of these types (sarcoma 37S, tar carcinoma 2146, and spindle-cell tar tumor 173) had an average Qo_2 of —5.6, compared with —16.6 for the same tumor strains as measured by CRABTREE and used by WEINHOUSE. Thus, even the unadjusted average tumor Qo_2 value employed by WEINHOUSE (—11.8) is, as the result of unwarranted bias in selection and incomplete utilization of available data, much too high.

11 WEINHOUSE's confusion is infectious, although mainly among investigators who do not themselves perform laboratory experiments on cancer metabolism. One may read, for example, "We hear about THE metabolism of THE cancer cell. Unfortunately, no such phenomenon has been established. . . . As Dr. WEINHOUSE said at the opening of the symposium, the critical difference between metabolism in malignant tissues and in normal tissues does not appear to reside in the major ways in which they handle carbohydrate metabolism." [Antimetabolites and Cancer (AAAS, Washington, D.C., 1955, pp. 305, 308)]. Such statements could scarcely be more incorrect or uninformed. They set the clock back and encourage the empirical approach to the problem of cancer by a sheer and vicarious denial of available fundamental information.

12 LEWIS, G. N., The Anatomy of Science (Yale Univ. Press, New Haven, Conn., 1926), p. 171.

13 In paragraphs 4, 5, and 6 of his note in this issue of Science, WEINHOUSE asks or raises several questions that have been asked, discussed, and answered many times in the literature of cancer.

14 The mechanism of the cancer respiratory impairment may indeed often involve lowered content of a particular respiratory enzyme, but this is not a necessary general requirement, since internal cellular arrangement and chemical or structural restraint of other correlated enzymes are, as in so many living phenomena, often of more decisive importance. Thus, certain ascites cancer cells have been found [B. CHANCE and L. N. CASTOR, Science 116 (1952), 200] to have unusually high contents of cytochrome *c*; but even in such ascites cells, the paraphenylenediamine and succinate oxidative responses are characteristically low or zero (1, p. 314); this is clearly indicative of respiratory restraint in spite of abnormally high absoute content of cytochrome *c* (compare 4, pp. 295—6). Oxidation-reduction potential restraints may well be involved here, as well as low contents of cytochrome *b* or DPNH demonstrated.

15 NEWTON, I., Opticks (W. and J. INNYS, London, ed. 2, 1718), pp. 344, 351.

16 Presented orally at the 1956 meeting of American Association for Cancer Research. [Proc. 2, 98 (Natl. Inst. of Health Information Release, 13 Apr.)].

17 A description of these quantitative potentialities and other qualitative aspects is in preparation.

36b On Respiratory Impairment in Cancer Cells*

By Otto Warburg

In 1950 George Klein of the Karolinska Institute, Stockholm, was kind enough to send to Dahlem a strain of mouse ascites cancer that consists of nearly 100 percent cancer cells, that can be transplanted with 100 percent takes, and that is resistant to the shaking necessary in manometry.

Only since that time have we been able to determine quantitatively the metabolism of pure cancer cells. All our previous experiments[1] had been carried out with solid tumors—that is, with various mixtures of cancer cells and normal cells. The more cancer cells a tumor contained, the higher was the fermentation and the lower was the respiration. But no absolute values could be obtained.

Thus, the year 1950 brought about the transition from the study of the metabolism of the mixed cells to the study of the metabolism of pure cancer cells, a very great progress in cancer research[2]. Weinhouse[3] is not appreciative of this progress, or of many important discoveries made since 1925—for example, the nonfermentation of the rapidly regenerating liver; the structural difference between energy production by respiration and by fermentation; the genetic autonomy of the respiring grana and the role of grana in the pathology of neoplasms; and carcinogenesis by respiratory poisons. Most of the comment by Weinhouse might have been written before 1925.

As expected, the fermentation of the pure cancer cells was found to be much higher than any previously observed fermentation of cancer cell mixtures. Indeed, mouse ascites cancer cells produced anaerobically per hour nearly 30 percent of their dry weight of lactic acid. In comparison with this enormous fermentation, respiration of the pure cancer cells was, as expected, very low.

Even more important were the results obtained in 1956 with Earle's *in vitro* cultures of pure mouse cancer cells. Such cells were available as two strains of high and low "malignancy," both derived from one and the same single cell. When, in the laboratory of Dean Burk, the respiration and the fermentation of these two strains of different malignancy but the same genetic origin were measured, the result was as follows: the higher the malignancy, the greater the fermentation and the smaller the respiration [(2 pp. 313-314)]. The absolute fermentation values for the high-malignancy cells were as high as the values for the mouse ascites cancer cells.

These experiments with pure cancer cells—the ascites cells and Earle's cells of different malignancy—were decisive and conclusive. They correspond, in the problem of relativity, to the observed red displacement in the gravitational field.

Among normal cells, the nearest equivalent to pure cancer cells is the chorion in the first days of embryonic development. The chorion grows rapidly. It is histologically almost pure. It is so thin that it is not necessary to slice it for measurements of metabolism. It is so hardy that it can be shaken many hours in mano-

---

* Republished from Science 124 (1956): 269 by permission.

metric vessels without disintegration. Anaerobically it produces 15 percent of its dry weight of latcic acid per hour, but aerobically it produces no lactic acid at all. Its respiration, in contrast to that of cancer cells, is high—indeed, nearly three times higher than the respiration of highly malignant, pure cancer cells.

Unlike the chorion, the whole embryo itself is unsuitable for such *in vitro* experiments, because it is disintegrated by the motion of the vessels if it is immersed in salt solutions or even in homologous serum. Yet the important question of lactic acid production by the living embryo can easily be decided by lactic acid determinations in the affluent and effluent blood vessels of an embryo *in situ* in a pregnant animal. If an embryo produced as much lactic acid as cancer cells, a very great increase in the effluent vessels would be found. But no increase has been found.

By these experiments—with chorion *in vitro*, and with the total embryo *in vivo* —it has been shown that intact embryonic cells, in contrast to cancer cells, produce no lactic acid aerobically.

Table 1 summarizes the average metabolic values obtained in serum with pure cancer cells of mice and with pure embryonic cells of mice. They constitute the

Cells	Q_{O_2}	$Q_M{}^{O_2}$	$Q_M{}^{N_2}$
Ascites cancer cells	— 7	30	70
Earle's cancer cells (high malignancy)	— 7	30	70
Earle's cancer cells (low malignancy)	— 13	10	25
Chorion of young embryos	— 17	0	35

Table 1. Average metabolic values obtained in serum with pure cancer cells of mice and with pure embryonic cells of mice. Q_{O_2} means cubic millimeters of oxygen consumed, and $Q_M{}^{O_2}$ and $Q_M{}^{N_2}$ mean cubic millimeters of lactic acid produced aerobically and anaerobically, respectively, per milligram (dry weight), per hour.

main basic facts. $Q_M{}^{N2} = 70$ means that the high-malignancy cancer cells produce anaerobically per hour an amount of lactic acid equal to 29 percent of their dry weight. The respiration, if normal, should be $Q_{O_2} = -35$, whereas $Q_{O_2} = -7$ was found. This means that the respiration of the high-malignancy cancer cells is only one-fifth of that of normal growing cells with $Q_M{}^{N2} = 70$, and only two-fifths of that of growing chorion of young embryo with a $Q_M{}^{N2} = 35$.

Obviously, nothing could be less enlightened than the opinion of WEINHOUSE that the respiration of cancer cells is as high, or even higher, than the respiration of normal growing cells. "High" and "low" respiration have greatest significance, of course, when compared with fermentation, as has been defined and emphasized many times since 1923, not only by the early use of such specific quotients as $Q_M{}^{O2}/Q_{O_2}$, and $Q_M{}^{N2}/Q_{O_2}$, but in my words of 1924 cited by WEINHOUSE, "The respiration of the carcinoma tissue is too small comparison with its glycolytic power." Without such specification, "high" and "low" can become meaningless; thus, the absolute value of respiration of normal connective tissue is very low, and yet it is no cancer, because the fermentation too is very low.

Many years before the respiratory enzymes and the fermentation enzymes of oxidation-reduction were discovered at Dahlem, we reached the conclusion that the biochemical mechanism of fermentation and respiration in cancer cells is qualitatively the same as in normal cells, the differences being only quantitative, the one process being increased and the other decreased. Although later investigators have confirmed this general conclusion, WEINHOUSE takes exception to the phraseology "damaged respiration" of cancer cells. But because the facts are so clear and well defined, our abridged expression should not be objectionable. We have here a perfect example of a dispute about words.

It is something deeper when WEINHOUSE dislikes the statement that the shifting of the energy production from the areobic to the anaerobic state is the cause of cancer. He feels that this is far too simple: How can cancer, as mysterious as life itself, be explained by such a simple physicochemical principle?

Yet this feeling is not justified. The problem of cancer is not to explain life, but to discover the differences between cancer cells and normal growing cells. Fortunately this can be done without knowing what life really is. Imagine two engines, the one being driven by complete and the other by incomplete combustion of coal. A man who knows nothing at all about engines, their structure, and their purpose, may discover the difference. He may, for example, smell it.

References

1 WARBURG, O., Metabolism of Tumors translated by F. DICKENS (Constable, London, 1930).
2 WARBURG, O., Science 123 (1956), 309.
3 WEINHOUSE, S., in Advances in Cancer Research 3 (1955), 269; Science, this issue.

37 Über die funktionelle Kohlensäure der Chlorella*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Die funktionelle CO_2 der Chlorella ist die chemisch gebundene CO_2, aus der bei der CO_2-Assimilation das Licht den Sauerstoff entwickelt. Es wird in dieser Arbeit beschrieben, wie die funktionelle CO_2 entdeckt worden ist und wie man sie messen und ihre Eigenschaften untersuchen kann.

Sättigt man Chlorella mit CO_2freiem Argon und fügt dann Fluorid hinzu[1], so wird in kurzer Zeit CO_2 bis zu einem Endwert ausgetrieben, der gleich dem Chlorophyllgehalt der Zellen ist, bei Variationen des Chlorophyllgehalts von 1% bis 8% des Zelltrockengewichts. 10^{-4}-*n*. Blausäure verhindert die Austreibung der CO_2 durch Fluorid vollständig, ebenso 5 Min. Erwärmen auf 65°. Das Fluorid wirkt also nicht direkt, sondern es setzt eine Fermentwirkung in Gang, bei der Schwermetall CO_2 aus einer Substanz abspaltet, die stöchiometrisch mit dem Chlorophyll verbunden ist. — Die Fluoridwirkung ist reversibel. Bringt man die mit Fluorid behandelten Zellen in reine Kulturlösung zurück, so vermehren sie sich fast ebenso schnell wie nicht mit Fluorid behandelte Kontrollzellen.

Auch durch Zusatz eines Tropfens Octanol kann man aus 1 Mol Chlorophyll der Chlorella 1 Mol CO_2 austreiben, doch ist die Octanolwirkung wegen der cytolysierenden Eigenschaften des Octanols irreversibel. Die Octanolwirkung lehrt, daß das mit organischen Lösungsmitteln isolierte Chlorophyll, also das Chlorophyll Willstaetters und Hans Fischers, diese CO_2 nicht enthält und daß sie deshalb in der Chlorophyllformel von Hans Fischer nicht vorkommt.

Will man, daß nach der Austreibung der CO_2 mit Fluorid die CO_2 wieder gebunden wird, so muß man der Chlorella nicht nur CO_2, sondern auch O_2 zur Verfügung stellen. Zur Bindung der CO_2 ist also Atmung oder, anders ausgedrückt, Energie nötig.

Ist die CO_2 gebunden, so kann das Licht O_2 entwickeln. Ist aber die CO_2 durch Fluorid ausgetrieben, so kann das Licht *keinen* O_2 entwickeln, soviel gelöste CO_2 die Chlorella auch enthalten mag. Belichtet man andererseits Chlorella und gibt dann Fluorid hinzu, so wird weniger CO_2 ausgetrieben als aus nicht belichteten Zellen. Aus alledem geht hervor, daß es die durch Fluorid austreibbare mit Chlorophyll verbundene CO_2 ist, aus der im Licht der O_2 entwickelt wird, während die gelöste CO_2 für das Licht nicht angreifbar ist. Die durch Fluorid austreibbare CO_2 nennen wir deshalb die funktionelle CO_2.

Unsere Auffassungen vom Mechanismus der CO_2-Assimilation werden hier-

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 11b (1956): 718.

Zusatz 1961. Mit dieser Arbeit begann die Entwicklung, die zur Entdeckung der „Glutaminsäure in Chlorella" und schließlich zur Entdeckung des Photolyten der Kohlensäureassimilation geführt hat. Vergl. die Arbeiten 45 und 78 dieser Sammlung. In dieser Arbeit ist der Begriff „funktionelle Kohlensäure" noch unklar, da die funktionelle Glutaminsäure noch nicht entdeckt war und also zwischen Kohlensäure aus Glutaminsäure und aerober Kohlensäure noch nicht unterschieden werden konnte.

durch bedeutend vereinfacht. Sensibilisierung und Radikale sind zur Erklärung des Energieumsatzes nicht mehr notwendig, wissen wir doch nunmehr, daß die CO_2 innerhalb desjenigen Moleküls reduziert wird, in dem das Licht absorbiert wird. Daß aber Licht, das in dem *einen* Teil eines Moleküls absorbiert wird, in dem *andern* Teil desselben Moleküls chemische Arbeit leisten kann, gehört zu den Grundtatsachen der Photochemie und ist von uns früher für den Fall eines Ferments in besonders überzeugender Weise bewiesen worden[2], für die Kohlenoxydverbindung der Eisenoxygenase, deren Kohlenoxyd mit der Quantenausbeute 1 von dem Eisen des Hämins abgespalten wird, wenn Licht in dem fernen Proteinteil, von dem Tryptophan und Tyrosin, absorbiert wird.

So kann man nunmehr in wenigen Worten und in der Sprache der Photochemie zusammenfassen, was die CO_2-Assimilation ist. Es ist die Photolyse einer CO_2-Chlorophyllverbindung mit der Besonderheit, daß diese CO_2-Verbindung aus energetischen Gründen nicht von selbst entstehen kann, sondern zu ihrer Entstehung der Energie der Atmung bedarf, einer Atmung, deren Brennstoff das Licht liefert:

$$3\,(\mathrm{ChlCO_2}) + 3\mathrm{N}_0 \cdot h \cdot \nu = 3\,\mathrm{Chl} + 3\,\mathrm{C} + 3\,\mathrm{O_2}$$
$$2\,\mathrm{C} + 2\,\mathrm{O_2} = 2\,\mathrm{CO_2} + 2 \cdot 100000\ \mathrm{cal.}$$
$$3\,\mathrm{Chl} + 3\,\mathrm{CO_2} = 3\,(\mathrm{ChlCO_2}) - 2 \cdot 100000\ \mathrm{cal.}$$

$$\text{Bilanz: } 1\,\mathrm{CO_2} + 3\,\mathrm{N}_0 \cdot h \cdot \nu = 1\,\mathrm{C} + 1\,\mathrm{O_2}$$

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind mit der einfachsten manometrischen Anordnung ausgeführt worden, mit den in Abb. 1 abgebildeten Kegeln. Eine Erweiterung dieser einfachen Technik erlaubt es nunmehr, auch Reaktionen, die bei höherer Temperatur ablaufen, manometrisch zu messen.

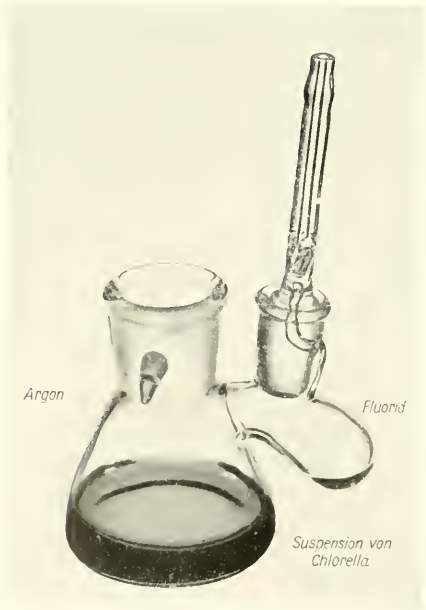


Abb. 1. Manometriegefäß zur Bestimmung der funktionellen Kohlensäure.

1. Natriumfluorid, anaerob

Will man die funktionelle CO_2, durch Fluorid austreiben, so muß die Suspensionsflüssigkeit so sauer sein, daß ein erheblicher Teil des Fluorids als Fluorwasserstoffsäure vorliegt; denn nur die freie undissoziierte Säure dringt in die lebende Chlorella ein. Wir suspendierten die Zellen in unserer Salzlösung „S" (Protokolle), deren pH 3,8 war, während für Fluorwasserstoffsäure ein pk von etwa 3,5 angegeben wird. Zur Entfernung der Kulturlösung wurden die Zellen zunächst mehrmals in der Salzlösung S gewaschen. Sie wurden dann in den Hauptraum kegelförmiger Manometriegefäße (Abb. 1) gebracht.

Z. B. enthielt ein Kegel im Hauptraum 3,83 μMole Chlorophyll, in 200 mm³ Zellen, in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), in der Birne 0,2 cm³ $n/5$-NaF (pH 3,8), im Gasraum reines CO_2freies Argon. Wurde das Fluorid (im Dunkeln) in den Hauptraum gegeben, so wurde in 20 Min. die funktionelle CO_2 ausgetrieben, während ohne Fluorid-Zusatz nur wenig CO_2 im Gasraum erschien (Abb. 2). Die Differenz der Druckänderungen *mit* und *ohne* Fluorid, multipliziert mit k_{CO_2}, ergab die durch Fluorid ausgetriebene CO_2. Im Versuch der Abbildung betrug die so berechnete funktionelle CO_2 85,8 mm³ = 3,83 μMole CO_2 (Protokoll 1). Es war also das Verhältnis

$$\frac{\text{Funktionelle } CO_2}{\text{Chlorophyll}} = \frac{3{,}83}{3{,}83} = 1{,}0.$$

2. Variation des Chlorophyllgehalts

Für den Versuch der Abb. 2 waren die Zellen in 25 cm Abstand von einer 300-Watt-Metallfadenlampe an einem Südfenster gezüchtet worden, wo sie sich in 2 Tagen in einer 250-cm³-Flasche von 60 auf 800 mm³ vermehrt hatten. Der Chlorophyllgehalt in 200 mm³ Zellen betrug 3,83 μMole, was etwa 7,7% des Zelltrockengewichts entspricht.

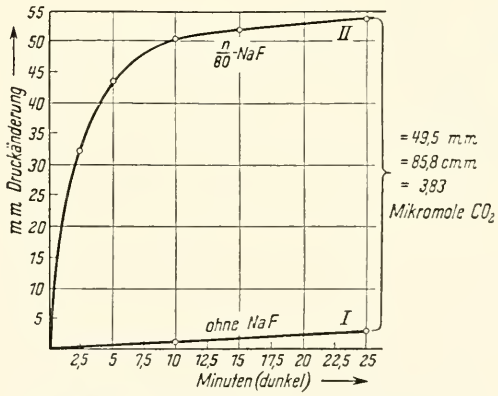


Abb. 2. Anaerobe Austreibung der funktionellen CO_2 durch Fluorid aus 200 mm³ Chlorella bei pH 3,8 und 20°. Dunkel. 3,83 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Chlorella in Argon (k_{CO_2} = 1,732 mm² bei 20°). 3,83 μ Mole Chlorophyll in 200 mm³ Chlorella.

Um Zellen niedrigeren Chlorophyllgehalts zu gewinnen, züchteten wir bei höherer Lichtintensität, indem wir die Kulturkolben nahe zwischen vier 200-Watt-Metallfadenlampen brachten. Wurden in 250 cm³ Kulturlösung 15 mm³ Zellen eingesät, so betrug nach 24 Stdn. die Ernte 178 mm³, die Zellen hatten sich also in einem Tag auf das 12fache vermehrt. 160 mm³ dieser Zellen enthielten nur 0,433 μMole Chlorophyll, entsprechend 1% des Zelltrockengewichts. Wurde für 160 mm³ dieser Zellen in der Anordnung der Abb. 1 die durch Fluorid austreibbare

CO_2 bestimmt, so wurden (Protokoll 2) 0,406 μMole CO_2 erhalten. Es war also das Verhältnis

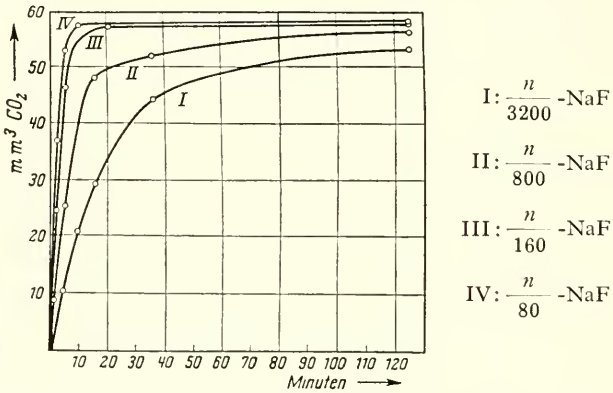
$$\frac{\text{Funktionelle } CO_2}{\text{Chlorophyll}} = \frac{0{,}406}{0{,}433} = 0{,}94;$$

also wiederum nahezu gleich 1, bei nur $^1/_8$ des Chlorophyllgehalts.

Methodisch ist zu dem Versuch zu bemerken, daß man die chlorophyllarmen Zellen besonders sorgfältig in der sauren Salzlösung S waschen muß, um alles Bicarbonat zu entfernen. Denn je weniger Chlorophyll die Zellen enthalten, um so mehr fällt eine Verunreinigung mit Bicarbonat ins Gewicht.

3. Variation der Fluorid-Konzentration

In dem Versuch der Abb. 2 war die Außenkonzentration des Fluorids 1/80-normal. Aber eine viel kleinere Fluorid-Konzentration, z. B. 1/3000-normal, kann die Kohlensäure austreiben, eine Konzentration, bei der die Zellen weniger Fluorid als Chlorophyll enthalten. Während also Kohlensäure- und Chlorophyllgehalt gleich sind, besteht keine Äquivalenz zwischen Fluorid und Kohlensäure oder, was dasselbe ist, zwischen Fluorid und Chlorophyll.



MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY MASS.

Abb. 3. Anaerobe Austreibung der funktionellen CO_2 aus 200 mm³ Chlorella durch verschiedene Fluorid-Konzentrationen bei pH 3,8 und 20°. Die CO_2-Entwicklung ohne Fluorid ist von den Kurven abgezogen. Dunkel I: $\frac{n}{3200}$-, II: $\frac{n}{800}$-, III: $\frac{n}{160}$-, IV: $\frac{n}{80}$-Fluorid. Die Zellen enthielten 2,59 μMole Chlorophyll, 2,58 Mole CO_2 wurden ausgetrieben.

In Abb. 3 ist ein Versuch graphisch dargestellt, bei dem die Außenkonzentration des Fluorids von 1/3200 bis 1/80-n variiert wurde. Die Chlorophyllmenge pro Gefäß betrug etwa 2,59 Mole. 2,58 μMole Kohlensäure waren durch 1/80-n. Fluorid nach 15 Min. ausgetrieben, während 1/3200-n Fluorid die Kohlensäure wesentlich langsamer austrieb.

4. Hemmung der Fluoridwirkung durch Blausäure

Für diese Versuche wurden kegelförmige Gefäße mit zwei im rechten Winkel zueinander angebrachten Birnen benutzt, so daß man zuerst die Blausäure und dann das Fluorid zu den Zellen geben konnte.

Z. B. enthielt der Hauptraum eines derartigen Kegels 3,4 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), die Birne I 0,3 cm³ n/1000-KCN, die Birne II 0,2 cm³ n/5-NaF (pH 3,8), der Gasraum Argon. Wurde zunächst das KCN in den Hauptraum gegeben, so entstand nur ein geringer Einkippdruck. Wurde dann das Fluorid in den Hauptraum gegeben, so wurden nach 15 Minuten die folgenden Endwerte an CO_2 erhalten:

ohne KCN ohne NaF CO_2 (mm³)	ohne KCN + NaF CO_2 (mm³)	+ KCN + NaF CO_2 (mm³)
5,2	85,2	5,8
	— 5,2	— 5,2
	80,0	0,6
	= 3,58 μMole CO_2	= 0,027 μMole CO_2

Bei Abwesenheit von Blausäure wurden also durch Fluorid aus 3,4 μMolen Chlorophyll 3,6 μMole CO_2 entwickelt, während bei Anwesenheit von 10^{-4}-n HCN keine CO_2 entwickelt wurde. Sogar bei 10^{-5}-n HCN fanden wir noch starke Hemmung der Fluoridwirkung. Hiernach gehört die Fermentreaktion, die durch das Fluorid in Gang gesetzt wird, zu den blausäure-empfindlichsten Lebensvorgängen und ist in dieser Hinsicht der Nitratreduktion[3] vergleichbar.

Methodisch ist zu bemerken, daß man darauf achten muß, daß bei dem Sättigen der Zellen mit Argon — wobei die Kegel 10 Minuten mit Argon durchströmt werden — keine Blausäure ausgetrieben wird. Man gibt deshalb in Birne I nicht HCN, sondern KCN, und man läßt deshalb das Gas durch diejenige der beiden Birnen ausströmen, die das Fluorid enthält.

5. Nichthemmung der Fluoridwirkung durch Phenanthrolin und durch Phenylurethan

α-α'-Phenanthrolin, ein Reagenz auf freie Schwermetallionen, hemmt in Konzentrationen von 1/100-normal die Lichtreaktionen[4] in Chlorella, sowohl die Reduktion der Kohlensäure als auch die Reduktion des Chinons. n/100-Phenanthrolin hemmt *nicht* die Fluoridwirkung in Chlorella.

Z. B. enthielt ein Kegel im Hauptraum 3,98 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung S (pH 3,8, 20°), in Birne I 0,2 cm³ n/10-Phenanthrolin (pH 3,8), in Birne II 0,2 cm³ n/5-NaF (pH 3,8), im Gasraum Argon.

Wurde zunächst das Phenanthrolin in den Hauptraum gegeben, so entstand nur ein geringer Einkippdruck. Wurde dann das Fluorid in den Hauptraum gegeben, so wurden nach 15 Min. die folgenden Endwerte an CO_2 erhalten:

— Phenanthrolin — NaF CO_2 (mm³)	— Phenanthrolin + NaF CO_2 (mm³)	+ Phenanthrolin + NaF CO_2 (mm³)
6,9	*97,0*	*96,5*
	— 6,9	— 6,9
	= 90,1	= 89,6
	= 4,03 μMole CO_2	= 4,01 μMole CO_2.

Aus 4 μMolen Chlorophyll wurden also bei Abwesenheit wie bei Gegenwart von Phenanthrolin 4 μMole CO_2 entwickelt, das heißt Phenanthrolin hemmte die Fluoridwirkung nicht.

Keine Hemmung der Fluoridwirkung fanden wir ferner, wenn wir von dem Narkotikum Phenylurethan (phenylcarbaminsaurem Äthyl) die hohe Konzentration von $6 \cdot 10^{-3}$-n einwirken ließen, die die CO_2-Assimilation vollständig hemmt.

Z. B. enthielt der Hauptraum eines Kegels 3,83 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung S (pH 3,8, 20°), die Birne I 0,2 cm³ 0,1 prozent. Phenylurethan, die Birne II 0,2 cm³ n/5-NaF (pH 3,8), der Gasraum Argon. Wurde zunächst das Phenylurethan in den Hauptraum gegeben, so entstand nur ein geringer Einkippdruck. Wurde dann das NaF in den Hauptraum gegeben, so wurden in 15 Minuten die folgenden Endwerte an CO_2 erhalten:

— Phenylurethan — NaF CO_2 (mm³)	— Phenylurethan + NaF CO_2 (mm³)	+ Phenylurethan + NaF CO_2 (mm³)
6,04	*92,5*	*94,0*
	— 6,0	—6,0
	= 86,5	= 88,0
	= 3,86 μMol CO_2	= 3,94 μMol CO_2

Aus 3,83 μMolen Chlorophyll wurden also bei Abwesenheit wie bei Gegenwart des Phenylurethans 3,9 μMole CO_2 entwickelt.

Im ganzen läßt sich aus den Hemmungen der Fluoridwirkung schließen, daß das Ferment der CO_2-Entwicklung, das durch Fluorid in Aktion gebracht wird, nicht an die Struktur gebunden ist, da es durch narkotische Struktur-Wirkungsstärken nicht gehemmt wird; daß es eine Schwermetallverbindung ist, da es spezifisch durch Blausäure gehemmt wird; und daß es keine dissoziierende Schwermetallverbindung ist, da es durch Phenanthrolin nicht gehemmt wird.

6. Octanol, anaerob

Wie durch Fluorid, so kann man die funktionelle CO_2 auch durch Octanol austreiben. Da jedoch Octanol auf Zellen cytolysierend wirkt, kann die mit Octanol ausgetriebene CO_2 nach Entfernung des Octanols nicht mehr aufgenommen werden.

Z. B. enthielt ein Kegel im Hauptraum 3,4 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Kulturlösung K (pH 4,3), in der Birne 0,1 cm³ Octanol, im Gasraum Argon. Wir fanden bei 20° nach Zugabe des Octanols in den Hauptraum, wenn wir den Einkippdruck des Octanols, der 9,5 mm betrug, abgezogen (v = 18,92 cm³, v_F = 3,1 cm³):

Min.	(mm) CO_2
5	+ 21
5	+ 14
20	+ 9
20	+ 2
10	+ 0,5
60	+ 46,5
	= 81,5 mm³ CO_2
	+ 3,63 μMole CO_2.

Waren auf diese Weise aus 3,4 μMolen Chlorophyll 3,63 μMole CO_2 anaerob ausgetrieben, so konnte durch Zusatz von Fluorid keine weitere CO_2 ausgetrieben werden. Die durch Octanol austreibbare CO_2 ist also dieselbe wie die durch Fluorid austreibbare CO_2.

Der Versuch zeigt, daß das mit den üblichen chemischen Methoden isolierte Chlorophyll die funktionelle CO_2 nicht enthalten kann.

7. Erwärmen, anaerob

Erwärmt man Chlorella in ihrer Kulturlösung (pH 4,3) 10 Minuten auf 46°, so wird aus 1 Mol Chlorophyll 1 Mol CO_2 ausgetrieben. Fluorid treibt nach dieser Behandlung keine CO_2 aus Chlorella aus, woraus hervorgeht, daß die durch Erwärmen und durch Fluorid austreibbare CO_2 dieselbe CO_2 ist.

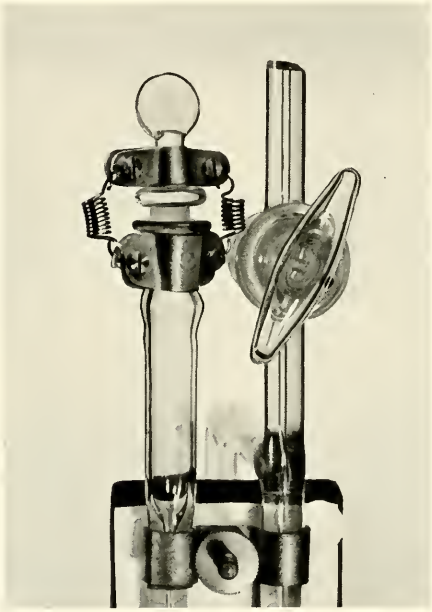


Abb. 4.
Verschluß des offenen Manometerschenkels

Erwärmt man aber die Chlorella schnell auf 65° und hält sie 5 Minuten auf 65°, so wird keine CO_2 ausgetrieben. Fluorid treibt nach dieser Behandlung keine CO_2 aus Chlorella aus, wodurch bewiesen wird, daß die Entwicklung der CO_2 aus Chlorella — sei es durch Fluorid, sei es durch Erwärmen auf 46° — eine Fermentreaktion ist.

Für diese Versuche war es notwendig, das Erwärmen unter manometrischem Verschluß vorzunehmen, da ja das Verhalten der Chlorella nicht nur *nach* dem Erwärmen, sondern auch *während* des Erwärmens untersucht werden sollte. Wir brachten zu dem Zweck an dem offenen Manometerschenkel eine drucksichere Verschlußvorrichtung an (Abb. 4). War der Kegel mit seinem Manometer verbunden, so wurde zunächst in der üblichen Weise bei 20° ausgeglichen und der Manometerstand in der üblichen Weise bei 20° abgelesen. Dann wurde der offene

Manometerschenkel verschlossen, der Kegel die gewünschte Zeit in heißes Wasser getaucht und wieder in den 20°-Thermostaten zurückgebracht. Schließlich wurde der Druckverschluß wieder entfernt und dann in der üblichen Weise der Manometerstand abgelesen. Die Methode bedeutet eine erhebliche Erweiterung der manometrischen Versuchsmöglichkeiten und wird vielfach benutzt werden. Man achte darauf, daß der Kegel nicht zu tief in das heiße Wasser eingetaucht wird, da sonst Wasser in die Kapillare destillieren könnte. Es kam niemals vor, daß die 3 Schliffe — der Schwanzhahn, der Tubusverschluß und der neue Verschluß — den erhöhten Druck nicht standhielten.

Z. B. enthielt der Hauptraum von 2 Kegeln je 3,4 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3,2 cm³ Kulturlösung „K" (pH 4,3), die Birne war leer, der Gasraum enthielt Argon. Der Kegel II 5 Minuten auf 65°. Nach Zurückbringen der Manometer auf 20° und nach 30 Minuten Ausgleich wurde gefunden (v = 18,68 cm³, v_F = 3,2 cm³, k_{CO_2} = 1,73):

nach 10′ 46°	nach 5′ 65°
CO_2	CO_2
(mm)	(mm)
+ 46	+ 3,5
= 79,6 mm³ CO_2	= 6,1 mm³ CO_2
= 3,56 μMole CO_2	= 0,27 μMole CO_2

Bei 46° wurden also aus 3,4 μMolen Chlorophyll 3,56 μMole CO_2 ausgetrieben, während bei 65° fast keine CO_2 ausgetrieben wurde. Die hier gefundene geringe Menge CO_2 wurde wahrscheinlich vor der Erreichung der Abtötungs-Temperatur entwickelt.

8. Fluorid, aerob

Alle bisher beschriebenen Versuche wurden unter anaeroben Bedingungen ausgeführt. Was aber geschieht, wenn wir die CO_2 unter aeroben Bedingungen austreiben?

Methodisch wird man hier zunächst das Bedenken haben, daß die Atmung die Messungen stört. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei hohen Fluoridkonzentrationen und hohen CO_2-Drucken die Atmung sehr stark gehemmt ist, so daß dann die Atmung nicht stört. — Größere Komplikationen macht, daß aerob, bei Gegenwart von CO_2, die CO_2 wieder gebunden wird, so daß aerob stationäre Zustände sich herausbilden, bei denen ebensoviel CO_2 entwickelt, als CO_2 wiederaufgenommen wird. Die Folge davon ist, daß man aerob *mehr* Fluorid braucht, um positive Drucke zu erzielen, als anaerob. Während anaerob 1/3200-n Fluorid bereits positive Drucke erzeugt, muß aerob die Fluoridkonzentration zur Erzeugung der gleichen positiven Drucke etwa 10mal höher sein. Man wird also aerob, erstens um die Atmung zu unterdrücken und zweitens wegen der Rückreaktion, möglichst hohe Fluoridkonzentrationen anwenden.

Z. B. enthielt der Hauptraum von Kegeln 3,0 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), die Birne 0,2 cm³ n/5-Fluorid (pH 3,8), der Gasraum verschiedene Gasmischungen. Wurde das Fluorid in den

Hauptraum gegeben, so wurden die in Tab. 1 verzeichneten Druckänderungen erhalten.

Der Versuch bestätigt zunächst, daß anaerob in CO_2-freiem Argon pro Mol Chlorophyll 1 Mol CO_2 gebunden ist. (Das Verhältnis ist hier etwas über 1, weil die anaerobe CO_2-Entwicklung ohne Fluoridzusatz nicht abgezogen ist; vgl. Protokoll 1.) Der Versuch zeigt ferner, daß anaerob *mehr* CO_2 gebunden wird, wenn ein CO_2-Druck vorhanden ist, offenbar, weil dann CO_2 als Bicarbonat, Carbaminsäure usw. gebunden wird. Der Versuch zeigt drittens — und das ist das Hauptergebnis —, daß bei sonst gleichen CO_2-Drucken aerob *mehr* CO_2 gebunden wird als anaerob. Der Unterschied ist erheblich. Er beträgt hier ein halbes Mol pro Mol Chlorophyll und wäre bei höheren CO_2-Drucken noch größer.

Tabelle 1

Gasgemisch (Vol.-%)	— Argon	10 CO_2 90 Ar	20 CO_2 80 Ar	10 CO_2 30 O_2 60 Ar	20 CO_2 20 O_2 60 Ar
k_{CO_2} (mm^2)	1,59	1,611	1,571	1,747	1,732
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
5′	+ 38,5	+ 44	+ 46	+ 47,5	+ 63,5
5′	+ 6,0	+ 10	+ 7,5	+ 8,5	+ 6,5
5′	+ 2,0	+ 1,5	+ 1,5	+ 4,0	+ 3,0
5′	+ 0	0	0	0	0
20′	+ 46,5	+ 55,5	+ 55,0	+ 60,0	+ 73,0
	= 74 mm^3	= 89,5 mm^3	= 86,2 mm^3	= 105 mm^3	= 127 mm^3
	= 3,3 μMole	= 4,0 μMole	= 3,85 μMole	= 4,7 μMole	= 5,65 μMole
CO_2	3,3	4,0	3,85	4,7	5,65
Chlorophyll	3	3	3	3	3
	= *1,1*	= *1,33*	= *1,28*	= *1,56*	= *1,88*

Es gibt also 3 Arten von gebundener CO_2 in Chlorella: Die erste Art ist unabhängig vom CO_2-Druck, die zweite ist abhängig vom CO_2-Druck, die dritte ist abhängig vom Druck der CO_2 *und* von der Anwesenheit von Sauerstoff. Alle drei Arten werden durch $n/80$-Fluoird ausgetrieben. 10^{-4}-n HCN hemmt die Austreibung der ersten Art vollständig, der zweiten Art gar nicht, der dritten Art unvollständig.

Man muß annehmen, daß die erste und die dritte Art funktionelle Bedeutung haben. Unter den Bedingungen, unter denen wir unsere Chlorella züchten, enthält sie die ganze CO_2 der ersten Art und einen Teil der dritten Art.

9. Reversibilität der Fluoridwirkung

Treibt man die CO_2 aus Chlorella, aerob oder anaerob, durch Fluorid aus und bringt dann die Zellen in reine Kulturlösung, so vermehren sie sich fast ebenso schnell wie Kontrollen, die nicht mit Fluorid behandelt worden sind. Die Fluoridwirkung ist also reversibel. Um dies direkter zu zeigen, treibt man die CO_2 mit Fluorid aus, wäscht das Fluorid fort, regeneriert mit Kohlensäure bei Anwesenheit von Sauerstoff und treibt die CO_2 wieder mit Fluorid aus. Bei der Regeneration ist die Anwesenheit von Sauerstoff notwendig.

Z. B. enthielt der Hauptraum eines Kegels 3 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), die Birne 0,03 cm³ n/10-NaF (pH 3,8), der Gasraum Argon. Wurde dann das Fluorid in den Hauptraum gegeben, so entstand eine Fluoridkonzentration von etwa 1/1000-n, und es wurden in 50 Minuten 67,4 mm³ CO_2 = 3 μMole CO_2 entwickelt. Das Fluorid wurde dann mit der Salzlösung „S" fortgewaschen, die Zellen wurden 30 Minuten in 10 Vol.-% CO_2; 30 Vol.-% O_2; 60 Vol.-% Argon gehalten und dann wieder mit reinem Argon gesättigt. Wurde dann aus der Birne 0,2 cm³ n/10-Fluorid (pH 3,8) in den Hauptraum gegeben, so wurden in 20 Minuten die folgenden Endwerte an CO_2 erhalten:

bei der ersten Austreibung mit Fluorid: 67,4 mm³ = 3,0 μMole CO_2,
bei der zweiten Austreibung mit Fluorid: 57,0 mm³ = 2,5 μMole CO_2.

Bei der ersten Austreibung mit Fluorid waren also aus 3 μMolen Chlorophyll 3 μMole CO_2 entwickelt worden, also die normale anaerobe Menge. Bei der zweiten Austreibung mit Fluorid wurden 2,5 μMole CO_2 entwickelt, also 85% des Anfangswerts, die in der Zeit der Regeneration wiederaufgenommen worden waren.

Wäscht man bei derartigen Versuchen nach der ersten Austreibung das Fluorid nicht fort, sondern sättigt sofort mit 10 Vol.-% CO_2; 30 Vol.-% O_2 und dann nach 30 Minuten wieder mit Argon, so zeigt, sich daß die gebundene CO_2, trotz der Anwesenheit des Fluorids, wieder zugenommen hat, falls die Fluoridkonzentration nicht zu hoch war. So kann man den stationären Zustand zwischen Austreibung und Bindung der CO_2, von dem im vorigen Abschnitt die Rede war, nachweisen und messen. Eine geeignete Fluoridkonzentration für diesen wichtigen Versuch ist 1/1000-normal.

10. Lichtwirkung nach Austreibung der CO_2 durch Fluorid

Setzt man aerob verschiedene Mengen Fluorid zu einer Chlorella-Suspension, mißt die positiven Drucke der entwickelten CO_2 und belichtet dann wie bei den Messungen der O_2-Kapazität, so findet man, daß die Lichtwirkung um so kleiner ist, je mehr CO_2 durch das Fluorid ausgetrieben worden ist. Der Symmetrie und der Einfachheit wegen sind auch diese Versuche mit Kegeln ausgeführt worden, wobei γ-Bestimmungen nicht möglich waren (mit der Hydrosulfitmethode bestimmt, ergaben sich die γ-Werte zu — 0,9 bis — 0,5).

Z. B. enthielt der Hauptraum von Kegeln 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), die Birne variierte Mengen Fluorid (pH 3,8), der Gasraum 10 Vol.-% CO_2; 30 Vol.-% O_2; 60 Vol.-% Argon. Wir fanden (Tab. 2):

Tabelle 2

n/10-NaF in der Birne	0 cm³ (mm)		0,03 cm³ (mm)		0,10 cm³ (mm)		0,20 cm³ (mm)	
5′ dunkel	— 5,0		0		+ 23,0		+ 45,0	
5′ dunkel	— 3,5		— 2,5		+ 1,0		+ 9,5	
5′ dunkel	— 3,0		— 3,0		— 3,5		— 1,5	
$\mathcal{J}$ = mm³ Quanten pro′ eingestrahlt	$\mathcal{J}_{rot}$ = 41		$\mathcal{J}_{rot}$ = 41		$\mathcal{J}_{rot}$ = 41		$\mathcal{J}_{rot}$ = 41	
5′ hell	+ 13	+ 12,5	+ 10	+ 9,5	+ 2,0	+ 3,0	+ 1,0	+ 1,0
5′ hell	+ 0,5		+ 0,5		— 1,0		0	

Aus dem Versuch geht hervor, daß eine niedrige Fluoridkonzentration, die nur wenig CO_2 austreibt, die Lichtwirkung nur wenig hemmt und daß eine Fluoridkonzentration, die den größten Teil der CO_2 austreibt, die Lichtwirkung fast vollständig hemmt; daß also nur die gebundene, durch Fluorid austreibbare CO_2 von dem Licht unter O_2-Entwicklung reduziert wird, während die physikalisch gelöste CO_2, von der bei diesem Versuch die Zellsuspension in jedem Kegel 280 mm³ enthielt, für das Licht nicht angreifbar ist.

Zur Vervollständigung des Versuchs haben wir noch geprüft, ob die Chinon-Lichtreaktion in Chlorella nach der Austreibung der CO_2 durch Fluorid noch vor sich geht und ob diese Reaktion durch Fluorid gehemmt wird. Zum Beispiel enthielt der Hauptraum eines Kegels 3,3 μMole Chlorophyll in 200 mm³ Zellen in 3 cm³ Kulturlösung „K" (pH 3,8, 20°), die Birne I 0,08 cm³ $n/10$-NaF (pH 3,8), die Birne II 2 mg Chinon in 0,2 cm³ H_2O, der Gasraum Argon. Wurde zunächst das Fluorid in den Hauptraum gegeben, so wurden in 20 Minuten 66 mm³ CO_2 = 2,94 μMole CO_2 entwickelt. Wurde dann das Chinon in den Hauptraum gegeben und mit weißem überschüssigem Licht belichtet, so fanden wir:

	ohne NaF	+ 0,08 cm³ NaF in 3 cm³
	k_{O_2} = 1,453	k_{O_2} = 1,555
	k_{CO_2} = 1,725	k_{CO_2} = 1,826
	(mm)	(mm)
	5′ dunkel + 2,0	+ 18,5
	5′ dunkel + 2,0	+ 11,5
	5′ dunkel + 1,5	+ 4,0
	5′ dunkel + 1,0	+ 2,0
	20′ dunkel + 6,5	+ 36
	= *11,2* mm³ CO_2	*66* mm³ = 2,94 μMole CO_2
	↓	↓
	+ 2 mg Chinon	+ 2 mg Chinon
	(mm)	(mm)
5′ hell	+ 39,5	+ 41,5
5′ hell	+ 36	+ 33,0
10′ hell	+ 75,5	+ 74,5
	= *110,5* mm³ O_2	= *115* mm³ O_2

Der Versuch zeigt, daß durch Austreibung der CO_2 mit Fluorid die Chinon-Lichtreaktion in Chlorella nicht beeinträchtigt wird; und ferner, daß Fluorid in der hier angewandten Konzentration von 1/420-normal die Wirkung des Lichts auf die Chinon-Reaktion nicht hemmt.

11. Wirkung des Fluorids nach Belichtung

Treibt man die O_2-Kapazität der Chlorella im Licht aus, verdunkelt dann und fügt Fluorid hinzu, so könnte man zunächst erwarten, daß nach der Belichtung um soviel weniger CO_2 durch Fluorid entwickelt wird, als O_2 ausgetrieben worden ist:

$$ChlCO_2 + h \cdot \nu = Chl + C + O_2.$$

Doch muß man bedenken, daß bereits *während* der Belichtung CO_2 wieder gebunden wird. Wäre γ während der Belichtung gleich —1, so würde die chemisch gebundene CO_2 bei der Belichtung gar nicht abnehmen. Da für die von uns ver-

wendeten Zellen im Licht γ etwa = —0,7 ist, so nahm durch die Belichtung die chemisch gebundene CO_2 ab. Der Einfachheit halber begnügen wir uns hier damit, qualitativ durch Versuche mit Kegeln zu zeigen, daß Fluorid nach der Belichtung weniger CO_2 austreibt und daß dieses Defizit bei der Erholung im Dunkeln, wenn Sauerstoff und Kohlensäure zugegen sind, wieder verschwindet.

Z. B. enthielten Kegel im Hauptraum 1 μMol Chlorophyll in 100 mm³ Zellen in 3 cm³ Salzlösung „S" (pH 3,8, 20°), die Birne 0,2 cm³ n/5-NaF (pH 3,8), der Gasraum 10 Vol.-% CO_2; 30 Vol.-% O_2; 60 Vol.-% Argon. Die Zellen stammten aus 1tägigen Kulturen, die mit fluktuierendem Licht gezüchtet worden waren und sich in 250 cm³ Kulturlösung von 30 auf 125 mm³ vermehrt hatten. Belichtet wurde mit grünem Licht der Intensität $\mathcal{J}$ = 60 mm³ Quanten pro Minute, wobei ein positiver Druck von 6,5 mm auftrat. Wurde dann sofort oder nach einer gewissen Dunkelzeit Fluorid in den Hauptraum gegeben, so fanden wir die folgenden Endwerte an CO_2 (v = 18,92 cm³, v = 3,2 cm³ k_{O_2} = 1,48, k_{CO_2} = 1,752, K_{O_2} = 3,65 für γ = —0,7):

	(mm)
Nach 30′ dunkel	+ 44,2
Nach 30′ dunkel 5′ hell	+ 36,8
Nach 30′ dunkel 5′ hell 30′ dunkel	+ 44,0

Somit ist nunmehr mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt worden, daß es die durch Fluorid austreibbare CO_2 ist, aus der im Licht O_2 entwickelt wird. Treibt man die CO_2 vorher mit Fluorid aus und belichtet dann, so wird im Licht kein Sauerstoff entwickelt; und belichtet man vorher und gibt dann Fluorid zu den Zellen, so wird nachher weniger CO_2 ausgetrieben als aus den nicht belichteten Zellen.

12. Optische Veränderungen nach Zusatz von Fluorid

Wenn Fluorid, wie es wahrscheinlich ist, in zwei Phasen wirkt, indem es zuerst die Vorstufe der CO_2, die eine Carbonsäure sein mag, von dem Chlorophyll abtrennt und indem dann aus dieser abgetrennten Säure das Schwermetall-Ferment die CO_2 abspaltet, so könnte es sein, daß sich in der ersten Phase das Chlorophyllspektrum ändert. Von einer solchen möglichen Änderung ist von vorneherein zu sagen, daß sie nur für „lebendes", nicht für extrahiertes Chlorophyll gefunden werden könnte, da bei der Extraktion die CO_2 entwickelt wird und damit die Unterschiede verschwinden müßten.

Technisch ist es heute leicht, mit Hilfe unserer Ulbrichtschen Kugel[5] die Chlorophyllbanden im Leben zu messen. Sie sind im Vergleich zu den Banden des extrahierten Chlorophylls verbreitert und unscharf. Änderungen bei Zusatz von Fluorid haben wir bisher nicht gefunden. Dagegen haben wir gefunden, daß die rote durch 366 mμ erregte Fluoreszenz des lebenden Chlorophylls bei Zusatz von Fluorid erheblich schwächer wird, und zwar gerade bei Zusatz solcher Fluoridmengen, die CO_2 austreiben und gerade in denjenigen Zeiten, in denen die CO_2 ausgetrieben wird. Diese Schwächung der Fluoreszenz ist vollständig reversibel.

Gegen die Bedeutung der Erscheinung spricht zunächst, daß 10^{-3}-n Blausäure die Schwächung der Fluoreszenz nicht verhindert, während 10^{-3}-n Blausäure die

Austreibung der CO_2 vollständig hemmt. Bei näherer Überlegung jedoch liegt hier kein Widerspruch vor, da auf das Chlorophyllspektrum nur die erste Phase wirken kann. Blausäure aber mit Bestimmtheit nur auf die zweite Phase wirkt.

Es ist also durchaus möglich, aber nicht bewiesen, daß die Schwächung der Fluoreszenz des lebenden Chlorophylls durch Fluorid mit der ersten Phase der Fluoridwirkung zusammenhängt.

Protokolle

Kulturlösung „K": 10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl, 4 g KNO_3, 1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ + 2 l Wasser. pH ist 4,3.

Salzlösung „S": 10g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl, 0,4 g NH_4Cl + 2 l Wasser + etwa 0,6 cm³ *n*. H_2SO_4. pH soll 3,8 sein.

n/5-NaF: 0,84 g NaF + 3,3 cm³ *n*. H_2SO_4 mit Wasser auf 100 cm³. pH ist 3,8.

Die Zellen für die Arbeit wurden in der früher üblichen Weise gezüchtet. Gegenüber Fluorid verhalten sich die auf verschiedene Weise gezüchteten Zellen ziemlich gleich — die großen Unterschiede zeigen sich erst bei der Entwicklung des Sauerstoffs.

Protokoll 1. Hoher Chlorophyllgehalt

Die Zellen wurden mit kontinuierlicher Intensität in der früher üblichen Weise an einem Südfenster gezüchtet und vermehrten sich in 2 Tagen von 60 auf ca. 800 mm³ Zellen in 250 cm³ Kulturlösung. Der Chlorophyllgehalt in 200 mm³ Zellen betrug 3,83 μMole, das ist bei 22,5% Trockengewicht 7,7% Chlorophyll.

Kegel ohne Einsätze mit 1 Birne. 20°. Dunkel.

		Kegel I	Kegel II
		v = 18,68 cm³	v = 18,73 cm³
		v_F = 3,2 cm³	v_F = 3,2 cm³
		k_{CO_2} = 1,725 mm²	k_{CO_2} = 1,732 mm²
Hauptraum:		200 mm³ Zellen in 3,0 cm³ S, pH = 3,8	200 mm³ Zellen in 3,0 cm³ S, pH = 3,8
Birne:		0,2 cm³ H_2O	0,2 cm³ *n*/5-NaF, pH 3,8
Gasraum:		Argon	Argon
		Nach Einkippen (mm)	Nach Einkippen (mm)
In	2,5′	+ 0,5	+ 32
	2,5′	0	+ 11,5
	5′	+ 1,0	+ 7,0
	5′	+ 0,5	+ 1,0
	10′	+ 1,0	+ 1,5
	20′	+ 0,5	0
	45′	+ 3,5	+ 53,0
		= 6,0 mm³	= 91,7 mm³
			— 6,0
			85,7 mm³
			= 3,83 μMole CO_2

$$\frac{CO_2}{\text{Chlorophyll}} = \frac{3{,}83}{3{,}83} = 1{,}0.$$

Protokoll 2. Niedriger Chlorophyllgehalt

	Kegel I	Kegel II
	$v = 18{,}68\ cm^3$	$v = 18{,}27\ cm^3$
	$v_F = 3{,}2\ cm^3$	$v_F = 3{,}2\ cm^3$
	$k_{CO_2} = 1{,}725\ mm^2$	$k_{CO_2} = 1{,}687\ mm^2$
Hauptraum:	160 mm^3 Zellen in 3,0 cm^3 S pH 3,8	160 mm^3 Zellen in 3,0 cm^3 S pH 3,8
Birne:	0,2 cm^3 H_2O	0,2 cm^3 $\frac{n}{5}$-NaF
Gasraum:	Argon	Argon
	Nach Einkippen (mm)	Nach Einkippen (mm)
In 6′	+ 2,5	+ 6,5
4′	+ 1,0	+ 2,5
5′	+ 0,5	+ 1,0
5′	+ 1,0	+ 0,5
20′	+ 5,0	+ 10,5
	= 8,62 mm^3	= 17,7 mm^3
		— 8,62
		= 9,08 mm^3
		= 0,406 $\mu M\ CO_2$

$$\frac{CO_2}{\text{Chlorophyll}} = \frac{0{,}406}{0{,}433} = 0{,}94.$$

Die Zellen wurden mit kontinuierlicher Intensität zwischen vier 200-Watt-Metallfadenlampen, die nahe an den Kulturkolben herangebracht wurden, gezüchtet. Einsaat 15 mm^3 Zellen in 250 cm^3 Kulturlösung K, Ernte nach 24 Stdn. 178 mm^3. pH war anfangs 4,3 und bei der Ernte 5,2. Die Zellen wurden sorgfältig 3mal in Salzlösung S (pH 3,8) gewaschen, um alles Bicarbonat zu entfernen. Man beachte, daß bei diesen chlorophyllarmen Zellen die Kontrolle ohne Fluorid sehr viel mehr ausmachte als bei den Zellen des Protokolls 1. Chlorophyllgehalt im Gefäß in 160 mm^3 Zellen 0,433 μMole. Kegel ohne Einsätze mit 1 Birne. 20^0. Dunkel.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, Günter, Z. Naturforschg. 11b (1956), 52 und 179; Warburg, O., Krippahl, Günter und Schröder, Walter, Naturwissenschaften 43 (1956), 237.

2 Warburg, O., und Negelein, E., Biochem. Z. 214 (1929), 64; 255 (1932), 247; Warburg, O., Schwermetalle, Berlin 1946; Heavy Metals, Clarendon Press Oxford 1949.

3 Warburg, O., und Negelein, E., Biochem. Z. 110 (1920), 66.

4 Warburg, O., Heavy Metals, Clarendon Press, Oxford 1949; Warburg, O., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 10b (1955), 639.

5 Warburg, O., und Krippahl, Günter, Z. Naturforschg. 9b (1954). 181.

38 Züchtung der Chlorella mit fluktuierender Lichtintensität*

Von O. Warburg, W. Schröder und H.-W. Gattung

Untersuchung der Bedingungen, unter denen Zellen entstehen, die das Licht gut oder schlecht ausnutzen. Das Ergebnis ist, daß gut ausnutzende Zellen nur dann entstehen, wenn die Lichtintensität, bei der gezüchtet wird, nicht konstant, sondern wie in der freien Natur fluktuierend ist. Ist die Lichtintensität konstant, so entstehen die Franck-Emersonschen Zellen, die 10 bis 12 Quanten benötigen, um 1 Mol. Sauerstoff zu entwickeln. Ist die Lichtintensität fluktuierend, so entstehen Zellen, die 4 und noch weniger Quanten benötigen, um 1 Mol. Sauerstoff zu entwickeln.

Seit Jahren haben wir darauf hingewiesen[1], daß heute, wo die physikalischen Methoden zur Messung des Quantenbedarfs bis zur Vollkommenheit entwickelt sind, die reproduzierbare Züchtung von Zellen bestimmter Eigenschaften das Hauptproblem der Energetik der Photosynthese ist.

Wir haben nunmehr eine bisher übersehene Variable der Kulturbedingungen gefunden. Schon lange wußten wir, daß die Zellen, die das Licht gut ausnutzen, in Kulturen an Südfenstern, im Sommer bei schönem Wetter, entstehen. Die Ursache war jedoch nicht, wie man zunächst denken sollte, die spektrale Zusammensetzung des Tageslichts, sondern es war die fluktuierende Intensität des Tageslichts, die um so mehr gegen die konstante Intensität der Metallfadenlampe in Betracht kam, je schöner das Wetter war.

Fluktuierende Lichtintensität

Um das fluktuierende Tageslicht auszuschalten, wurde in Räumen gezüchtet, die gegen Tageslicht abgedunkelt waren. Als Lichtquelle dienten Metallfadenlampen, die bei 220 V, 300 W verbrauchten, deren Betriebsspannung aber durch einen automatisch sich ändernden Widerstand im Lauf von 24 Stunden von 50 auf 220 V anstieg und wieder auf 50 V absank. Dabei änderte sich nicht nur die Intensität, sondern auch, wie in der freien Natur, die spektrale Zusammensetzung des Lichtes. Die den verschiedenen Betriebsspannungen entsprechenden Quantenintensitäten

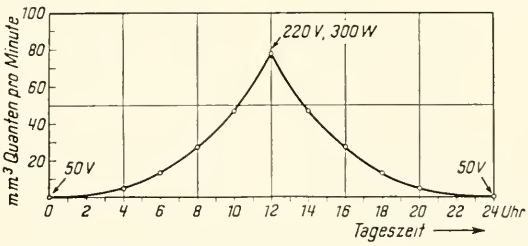


Abb. 1. Erster Modus der Fluktuation des Lichts.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 11b (1956): 654.

Zusatz 1961. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit hat es kaum mehr Sinn, Quantenausbeuten in beliebig gezüchteter Chlorella zu bestimmen. Die beste Bolometrie und Manometrie genügen nicht, wenn der Züchtung der Zellen keine Beachtung geschenkt wird.

wurden mit dem Chlorophyll-Quantenaktinometer[2] gemessen, das nur Licht mißt, das von dem Chlorophyll absorbiert wird und deshalb hier ein unersetzliches Hilfsmittel war, um ein Bild von den zeitlichen Änderungen der Quantenintensitäten zu erhalten.

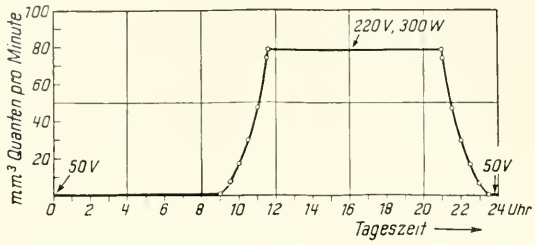


Abb. 2. Zweiter Modus der Fluktuation des Lichts.

Natürlich kann man die Lichtintensität in der verschiedensten Weise fluktuieren lassen. Wir haben vorwiegend 2 Arten von Fluktuation angewendet, die in den Abb. 1 und 2 graphisch dargestellt sind.

Züchtung der Zellen. Vgl. das Protokoll.

Messung des Quantenbedarfs

Der Quantenbedarf der O_2-Entwicklung wurde in der normalen Kulturlösung gemessen, bei geringer Zelldichte, bei so starker Belichtung, daß die Atmung etwa 10fach überkompensiert war; so daß es bei der Berechnung der Ausbeute wenig ausmachte, ob man die Atmung berücksichtigte oder nicht.

Das Meßlicht war der Spektralbezirk um 646 mμ, das katalytische Licht der Spektralbezirk um 457 mμ. Im Ganzen war die Anordnung wie in der Arbeit über das Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts[3]. Ein Versuch ist in dem folgenden Protokoll genau beschrieben und in Abb. 3 graphisch dargestellt.

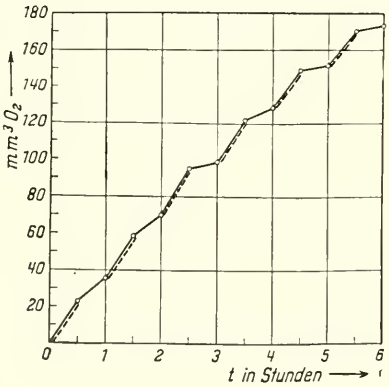


Abb. 3. Durch rotes Licht (646 mμ), *ohne* Zusatz und *mit* Zusatz von blaugrünem Licht (457 mμ) entwickelter Sauerstoff. ——— ohne Zusatz von Blaugrün, = = = = mit Zusatz von Blaugrün. Die Zellen waren mit fluktuierender Lichtintensität gezüchtet worden. Der Quantenbedarf betrug in der ersten Stunde + Blaugrün 4,33 (einschl. Atmung 3,84), in der ersten Stunde — Blaugrün 6,6, in der ganzen Zeit + Blaugrün 4,5 (einschl. Atmung 4,35), in der ganzen Zeit — Blaugrün 14. Einzelheiten in Protokoll 1.

Läßt man das blaugrüne Licht längere Zeit einwirken, so nimmt die Wirkung oft wieder ab, wahrscheinlich, weil das Luminoferment durch Überbelichtung inaktiviert wird. Wir haben deshalb das Blaugrün in Perioden von 30 Min. fortgenommen und wieder zugesetzt.

Ergebnisse

Züchtet man an einem Südfenster in einem Gemisch von Tageslicht und konstantem Metallfadenlicht, so erhält man je nach dem Wetter Zellen, die das Licht gut oder schlecht ausnutzen. Auf diese Weise sind unsere Versuchszellen in den letzten Jahren gezüchtet worden.

Züchtet man bei Ausschluß von Tageslicht mit konstantem Metallfadenlicht, so erhält man Zellen, die eine schlechte Ausbeute geben. Um 1 Mol. Sauerstoff zu entwickeln, benötigen diese Zellen 10 bis 12 und noch mehr Quanten.

Züchtet man bei Ausschluß von Tageslicht mit *fluktuierendem* Metallfadenlicht, so erhält man Zellen, die im Mittel 4 bis 4,5 Quanten benötigen, um 1 Mol. Sauerstoff zu entwickeln, und zwar bei 10facher Kompensation der Atmung (Tab. 1 und 2).

In den Tab. 1 und 2 ist das Ergebnis von 34 Versuchen verzeichnet, von denen 30 Versuche sich über 6 Stunden ausdehnten. Alle Versuche sind wie der Versuch des folgenden Protokolls ausgeführt worden, und kein so ausgeführter ist in den Tabellen ausgelassen worden. Da unter ihnen Versuche sind, die bei Berücksichtigung der Atmung sich dem Quantenbedarf 3 nähern, so sind wir der Meinung, daß man noch Fluktuierungs-Bedingungen finden wird, unter denen man 3 als Mittelwerte erhalten wird.

Was die Genauigkeit anbetrifft, so entnimmt man dem Protokoll, daß die Druckänderungen bei Zusatz von Blaugrün in der ersten Stunde + 11 für das kleine Gefäß und + 4 mm für das große Gefäß betrugen; und daß die entsprechenden Druckänderungen in der Gesamtheit für das kleine Gefäß + 30,5 und für das große Gefäß + 10,5 mm betrugen. Multipliziert man diese Werte mit 30, der Zahl der Versuche, so erhält man die Druckänderungen, aus denen die Mittelwerte der Tabellen berechnet worden sind, das sind so große Druckänderungen, daß die Ablesefehler dagegen völlig verschwinden.

Wenn es auch nicht in den Zusammenhang dieser Arbeit gehört, sei hier doch darauf hingewiesen, daß wir wiederum bei allen Versuchen, bei denen Blaugrün zugesetzt wurde, γ-Werte erhielten, die sich 1,3 näherten, das ist der Wert, den man bei Bildung von Glykolsäure aus Kohlensäure und Wasser finden muß.

Schließlich sei noch die Frage aufgeworfen, warum die sehr zahlreichen Botaniker, die seit 37 Jahren nach unsern Vorschriften Chlorella für Photosynthese-Versuche züchten, nicht darauf gekommen sind, daß die ununterbrochene konstante hohe Belichtung unphysiologisch ist. Es ist darauf zu antworten, daß unter den alten Zuchtbedingungen, unter denen für die ersten Tage das Licht im Überschuß ist, eine gute oder schlechte Ausbeute durch den Betrag der Ernten nicht erkannt wird; und außerdem, daß es sehr wenig Institute gibt, in denen der Quantenbedarf hätte bestimmt werden können.

Protokoll

Zellen: Raum gegen Tageslicht verdunkelt. 300-W-Metallfadenlampe, Intensität fluktuierend nach Abb. 2. Abstand der Zuchtkolben von der Lampe 25 cm. In Kultursalzlösung + Mikroelementen[4], unter Durchleitung von 5 Vol.-Proz. CO_2, 30 Vol.-Proz. O_2, 65 Vol.-Proz. Argon. pH

Datum	Für die 1. Stde.		Für die Gesamtzeit (6 Stdn.)		Für die 1. Stde. + Blaugrün Pos. O_2-Entwickl. / Atmung
	$\frac{1}{\varphi}$ (+ Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (— Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (+ Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (— Blaugrün)	
27. 3.	5.67	16.8	5.22	[∞]	8.9
12. 4.	5.76	17.5	5.68	21	7.0
13. 4.	4.76	12.2	4.80	20	7.5
16. 4.	4.02	10.9	4.65	19	9.6
17. 4.	3.61	9.9	4.05	12	11
18. 4.	5.25	14.3	5.70	16	8.7
20. 4.	4.23	7.2	4.86	11	9.7
23. 4.	5.19	19.8	5.27	26	8.4
24. 4.	4.80	19.3	4.85	19	9.2
25. 4.	4.09	13.2	4.85	19	11
26. 4.	4.14	10.7	4.53	20	12
30. 4.	4.55	11.9	5.30	21	9.0
2. 5.	4.27	11.9	5.18	17	14
4. 5.	4.17	14.8	5.67	24	11
8. 5.	4.84	12.0	5.80	18	11
9. 5.	4.03	18.4	4.70	16	13
11. 5.	5.42	15.0	5.62	25	11
15. 5.	5.29	11.7	5.44	21	11
Mittel	*4.67*	*13.8*	*5.12*	*18.0*	*10.2*
+ Atmung	*4.23*	*12.6*	*4.65*	*16.5*	

Tab. 1. $\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Quanten absorbiert}}{\text{mm}^3\ O_2\text{, positiv entwickelt}}$. Fluktuierend gezüchtet nach Abb. 1 oder 2.

Datum	Für die 1. Stde.		Für die Gesamtzeit (6 Stdn.)		Für die 1. Stde. + Blaugrün Pos. O_2-Entwickl. / Atmung
	$\frac{1}{\varphi}$ (+ Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (— Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (+ Blaugrün)	$\frac{1}{\varphi}$ (— Blaugrün)	
7. 5.	4.52	22.7	5.87	35	9.1
8. 5.	4.52	17.8	5.07	39	9.0
14. 5.	4.25	10.4	4.57	19	8.4
16. 5.	5.27	37.3	5.62	30	7.3
17. 5.	4.32	7.7	4.48	14	10.3
22. 5.	5.12	19.5	5.40	40	7.0
24. 5.	3.80	7.4			11.0
24. 5.	3.64	27.6			11.0
28. 5.	4.30	26.3			9.8
31. 5.	4.62	22.1	5.04	30	8.9
31. 5.	5.06	36	5.50	41	8.1
1. 6.	5.13	36	5.14	45	8.9
7. 6.	4.95	21.0	4.55		8.3
7. 6.	4.60	17.0	4.62	29	8.9
18. 6.	4.41	15.4	4.37	20	11.0
19. 6.	4.95	11.0	5.01	12	11.6
Mittel	*4.60*	*21*	*5.01*	*29.5*	*9.3*
+ Atmung	*4.15*	*19*	*4.5*	*27*	

Tab. 2. $\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Quanten absorbiert}}{\text{mm}^3\ O_2 \text{ positiv entwickelt}}$. Fluktuierend gezüchtet nach Abb. 2.

anfangs 4,3, bald etwa 5. Temperatur 25°. Zuchtkolben 250 cm³. Einsaat 30 mm³ Zellen. Ernte nach 24 Stdn. 125 mm³ Zellen. Zentrifugiert und mit frischer Kulturlösung auf 4,5 mm³:7 cm³ gebracht. Mit $n/10$-NaOH auf pH 5,1 gebracht. Vor der Messung (als einziges Mikroelement) 100 γ 5-wertiges Vanadium pro l zugegeben, als $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$.

Manometrie: Bei 20°. Gasraum 10 Vol.-Proz. CO_2-Luft. Gefäßpaar. Quarzkästchen.
Kleines Gefäß: $v' = 16.61$; $v'_F = 7.00$; $k'_{O_2} = 0.916$; $k'_{CO_2} = 1.504$.
Großes Gefäß: $v = 20{,}849$; $v_F = 7{,}00$; $k_{O_2} = 1{,}312$; $k_{CO_2} = 1.899$.
Berechnung: $x_{O_2} = H' \cdot 7{,}75 - H \cdot 9{,}79$, $x_{CO_2} = -H' \cdot 11{,}17 + H \cdot 15{,}99$.
Rechenprobe: Angenommen $x_{O_2} = +100$ cmm; $x_{CO_2} = -100$ cmm.

$$H' = \frac{+100}{0.916} - \frac{100}{1.504} = +42.6,$$

$$H = \frac{+100}{1.312} - \frac{100}{1.899} = +23.4.$$

Also: $x_{O_2} = 42{,}6 \cdot 7.75 - 23.4 \cdot 9.79 = +100$, $x_{CO_2} = -42.6 \cdot 11.17 + 23.4 \cdot 15.99 = -102$.

Lichtabsorption, gemessen mit der Ulbrichtschen Kugel, anfangs und am Ende: für das rote Licht: 22,4 Prozent, für das blaugrüne Licht: 50 Prozent.

Meßlicht: Kinolampe 500 W, 5 A. 5 cm fließendes Kühlwasser. Interferenzscheibe 646 mμ. I = 13,72 mm³ Quanten pro Minute auf jeder Seite.

Katalytisches Licht: 300-W-Xenon-Hochdrucklampe. In fließendem Wasser befindlich: 2 cm $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ 10%; 2 mm Blauglas Nr. 12 von Schott. In Luft: Interferenzfilter 457 mμ. I = 1,02 mm³ Quanten pro Minute auf jeder Seite.

Belichtung 30 Min. mit (+) und ohne (—) Blaugrün	Abgelesene Drucke [mm]	
	Kleines Gefäß	Großes Gefäß
+	+ 5.5	+ 2.0
—	+ 3.5	+ 1.5
+	+ 5.5	+ 2.0
—	+ 4.0	+ 2.0
+	+ 4.5	+ 1.0
—	+ 3.0	+ 2.0
+	+ 5.5	+ 2.0
—	+ 4.0	+ 2.5
+	+ 4.5	+ 1.5
—	+ 3.5	+ 2.5
+	+ 5.0	+ 2.0
—	+ 3.5	+ 2.5

Tab. 3. Zur Berechnung addiert man die unterstrichenen mm für sich und die nicht unterstrichenen mm für sich und erhält so die Wirkungen + Blaugrün und — Blaugrün.

1. Stde. + Blaugrün: $H' + 11$; $H + 4$; $x_{O_2} + 46$; $x_{CO_2} - 59$; $\gamma - \underline{1.28}$; $\frac{1}{q} = \underline{4.33}$.

1. Stde. — Blaugrün: $H' + 7.5$; $H + 3.5$; $x_{O_2} + 23.9$; $x_{CO_2} - 28$; $\gamma - 1.17$; $\frac{1}{q} = 7.7$.

Ganze Zeit + Blaugrün: $H' + 30.5$; $H + 10.5$; $x_{O_2} + 133$; $x_{CO_2} - 172$; $\gamma - \underline{1.30}$; $\frac{1}{q} = \underline{4.5}$.

Ganze Zeit — Blaugrün: $H' + 21.5$; $H + 13$; $x_{O_2} + 39.5$; $x_{CO_2} - 32$; $\gamma - 0.81$; $\frac{1}{q} = 14$.

Literatur

1 Warburg, O., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 12 (1953), 356.
2 Warburg, O., und Schocken, V., Arch. Biochemistry 21 (1948), 363.
3 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 10b (1955), 631.
4 Vorschriften diese Z. 10b (1955), 631. Die Lösung des $NaVO_3$ muß im Dunkeln aufbewahrt werden.

39 Ausbau der manometrischen Methoden*

Von Otto Warburg und Günter Krippahl

Adolf Windaus zu seinem 80. Geburtstag gewidmet

Wir beschreiben im folgenden zwei neue manometrische Methoden, die wir für zellphysiologische Untersuchungen ausgearbeitet haben, die aber auch für allgemein-chemische Arbeiten von Nutzen sein werden.

I. Bestimmung des Sauerstoffs mit Dithionit in Gegenwart von Kohlensäure

Das kegelförmige Gefäß, das in Abbildung 1 abgebildet ist, und das man sich mit seinem Manometer verbunden im Thermostaten bei 20° denke, enthält im Hauptraum *m*/50 Phosphatlösung, die auf pH 3,8 angesäuert ist, in der Birne 20 mg trockenes bicarbonatfreies** Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) und 20 mg trockenes $CaCl_2$, im Gasraum 10 Vol.-% CO_2 und 1 bis 3 Vol.-% Sauerstoff. Solange sich

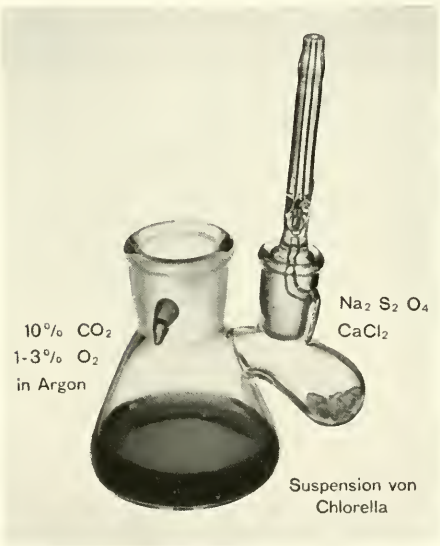


Abbildung 1. Gefäß zur manometrischen Bestimmung des Sauerstoffs bei Gegenwart von Kohlensäure

das $Na_2S_2O_4$ in der Birne befindet, wird kein Sauerstoff absorbiert. Spült man aber den Inhalt der Birne in den Hauptraum, so wird das $Na_2S_2O_4$ gelöst, und der Sauerstoff wird schnell und vollständig absorbiert.

Die Methode beruht auf zwei Voraussetzungen, die nicht selbstverständlich sind:

---

* Aus Justus Liebigs Annalen der Chemie 604 (1957): 94.

** $Na_2S_2O_4$, das frei von Bicarbonat ist, erhielten wir von der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik, Ludwigshafen, wofür wir auch hier danken.

Zusatz 1961. Dithionit als saures Absorptionsmittel für O_2 hat den Nachteil, daß sich bei Zugabe von Wasser schweflige Säure entwickelt. Wir haben deshalb das Dithionit ersetzt durch trockenes Chromchlorür, wie in Beitrag 77 beschrieben.

erstens, daß das Dithionit, wenn es in der Birne durch $CaCl_2$ geschützt ist, trotz erheblicher Wasserdampftension bei 20° keinen Sauerstoff verbraucht; zweitens, daß das Dithionit trotz der sauren Reaktion von pH 3,8 den Sauerstoff schnell und vollständig absorbiert. Ein Absorptionsmittel, das Sauerstoff nur bei alkalischer Reaktion absorbieren würde, oder das schon vor der Benetzung Sauerstoff absorbieren würde, wäre für unsere Zwecke nicht brauchbar gewesen.

Prüfung der Methode

Zur Prüfung der Methode wurde in dem mit seinem Manometer verbundenen Gefäß, dessen Gasraum 10 Vol.-% CO_2-Argon, aber keinen Sauerstoff enthielt, ein Sauerstoffdruck entwickelt und dann geprüft, ob dieser Sauerstoffdruck beim Einkippen des Dithionits schnell und vollständig wieder verschwand.

Zur Ausführung verwendeten wir kegelförmige Manometrie-Gefäße mit zwei Birnen. Der Hauptraum enthielt eine Lösung von H_2O_2, die Birne I Katalase, die Birne II Dithionit + Calciumchlorid. Zunächst wurde die Katalase in den Hauptraum gegeben und dadurch Sauerstoff in den Gasraum entwickelt. Dann wurde das Dithionit in den Hauptraum gegeben und dadurch der entwickelte Sauerstoff wieder absorbiert. Der „Einkippdruck" der Salze $Na_2S_2O_4$ + $CaCl_2$ wurde in jedem Fall mitbestimmt und zu dem negativen Druck addiert. Wir fanden in mm Brodie:

nach Zugabe der Katalase:	+ 185	+ 187	+ 97,5	+ 185	+ 186,
nach Zugabe des $Na_2S_2O_4$:	— 184,5	— 188	— 99	— 184,5	— 185,5,

also eine sehr befriedigende Übereinstimmung zwischen entwickeltem und absorbiertem Sauerstoff.

Experimentelle Einzelheiten. Volumen des Gefäßes 20,91 ccm. Bei 20° Gefäßkonstante für Sauerstoff k_{O_2} = 1,66 qmm. Hauptraum 3 ccm *m*/50 Phosphat pH 3,8 + etwa 14 bis 28 Mikromole H_2O_2. Birne I 50 γ Katalase BOEHRINGER. Birne II: 20 mg $Na_2S_2O_4$ + 20 mg $CaCl_2$. Gasraum 10 Vol.-% CO_2-Argon. Temperatur 20°. Nach Einkippen der Katalase zum Beispiel in 2′ + 169 mm, in 3′ + 18 mm, in 5′ 0 mm; Summe + 187 mm. — Nach Einkippen des Dithionits: in 2′ — 146 mm, in 3′ — 13 mm, in 5′ — 2 mm, in 5′ 0 mm; zusammen — 161 mm. Einkippdruck + 27 mm. Summe — 188 mm.

Anwendung der Methode

Die Methode hat den Nachteil aller Differenzmethoden, daß sie um so ungenauer wird, je höher der Druck des zu bestimmenden Gases ist; und daß sie, bei Benutzung der gebräuchlichen Apparatur der biochemischen Manometrie, nur anwendbar ist bis zu Sauerstoffdrucken von etwa 300 mm Wasser. Die Methode hat den weiteren Nachteil, daß bei der Oxydation des Dithionits

$$Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O \rightarrow NaHSO_4 + NaHSO_3$$

schweflige Säure entsteht, deren Dampfdruck zwar bei pH 3,8 nicht stört, die aber aus Zellen Kohlensäure austreibt, was bei Versuchen mit *Chlorella* berücksichtigt werden muß.

Die Methode ist also in keiner Weise der 2-Gefäßmethode ebenbürtig, die wegen ihrer Einfachheit, Sicherheit und Genauigkeit die Standard-Methode der biochemischen Manometrie bleiben wird. Trotzdem wird die neue Methode in manchen Fällen, insbesondere bei der manometrischen Untersuchung rein chemischer Reaktionen, sich von Nutzen erweisen. Es sei dazu bemerkt, daß eine andere Methode, an die man hätte denken können, die manometrische Bestimmung des Sauerstoffs durch Verbrennung zugesetzten Wasserstoffs oder Kohlenoxyds, wegen der Boudouard'schen Reaktion nicht möglich ist, wenn Kohlensäure und Wasser zugegen sind.

II. Manometrie bei höheren Temperaturen

Da viele Reaktionen bei der Temperatur unserer Meß-Thermostaten zu langsam verlaufen, aber die Temperatur der manometrischen Meß-Thermostaten aus vielen Gründen nicht beliebig gesteigert werden kann, so schlagen wir als Ausweg vor, daß man bei Zimmertemperatur mißt, aber in einem andern Wasserbad erhitzt. Dies ist auf folgende Art möglich:

In den Hauptraum eines Manometrie-Gefäßes wird die Lösung gegeben, die zur Reaktion gebracht werden soll; die Birne bleibt leer. Das Gefäß, mit seinem Manometer verbunden, wird im Thermostaten bei 20° ausgeglichen, die Manometerstellung wird bei 20° abgelesen. Dann wird der offene Manometerschenkel durch einen andrückbaren Schliff, wie in Abbildung 2 erläutert, verschlossen. Nachdem dies geschehen, nimmt man Gefäß + verschlossenes Manometer heraus und

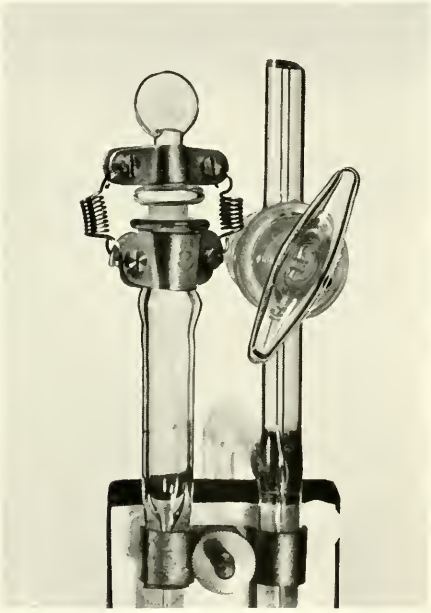


Abbildung 2. Vorrichtung zum Verschluß des offenen Manometerschenkels.

taucht das Gefäß bis zu etwa $^1/_3$ seiner Höhe in heißes Wasser der gewünschten Temperatur. Ist die Reaktion in der Hitze abgelaufen, so wird das Gefäß mit seinem Manometer in den 20°-Thermostaten zurückgebracht. Hier wird dann der verschlossene Manometerschenkel wieder geöffnet, und es wird die Manometerstellung wieder abgelesen. Die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Ablesung bei 20° ergibt die Reaktion, die in der Hitze vor sich gegangen ist. Hat man reines Wasser in den Hauptraum eingefüllt, so ist nichts vor sich gegangen und die Differenz ist Null. Diese Kontrolle, die eine Prüfung der Schliffe ist, sollte immer gemacht werden.

40 Weiterentwicklung der manometrischen Methoden*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Beschreibung von Manometriegefäßen mit verbessertem Absorptionseinsatz; mit sehr dünnem Gefäßboden für Röntgenstrahlen-Dosimetrie; mit Birnen für die 2-Gefäßmethode.

Die hier beschriebenen Gefäße sind z. T. zum Patent, z. T. zum Musterschutz angemeldet. Der alleinige Vertrieb für Deutschland ist der Firma Helmut Hanff, Berlin-Wittenau, Oranienburger Straße 169, übertragen, für USA: American Instrument Company Silver Spring, Maryland.

I. Einsätze zur Absorption der Kohlensäure

Den zylindrischen Einsatz der Manometriegefäße, der zur Aufnahme der Gasabsorptionsmittel dient, haben wir ersetzt durch eine in das Gefäß eingeschmolzene Wanne (Abb. 1 und 2). Wegen der zentralen Lage der Wanne, wegen der

Abb. 1. Kegelförmiges Gefäß mit Wanne. Der Wannenrand ist gewölbt, damit beim Neigen des Gefäßes keine Flüssigkeit aus der Wanne in den Hauptraum fließt. Die Kerbe in der Wanne dient zur Einführung der Pipette. Volumen ca. 20 cm³.

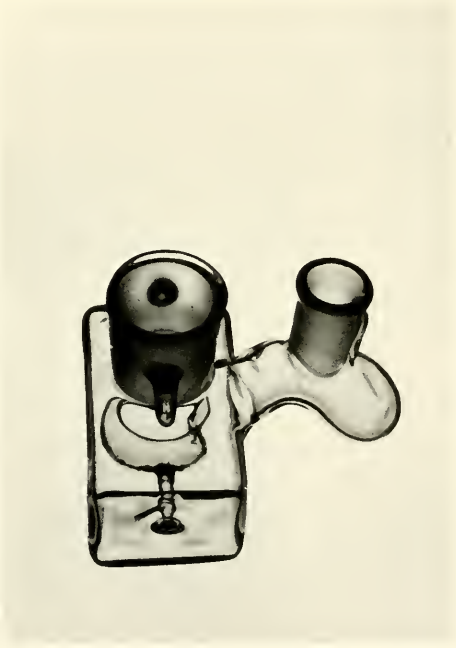


Abb. 2. Wie 1, aber Kastengefäß mit Wanne. Volumen ca. 18 cm³.

größeren Oberfläche der absorbierenden Lösungen in der Wanne und wegen der Bewegung der absorbierenden Lösungen in der Wanne beim Schütteln werden die Gase aus dem Gasraum schneller absorbiert als in den alten Gefäßen. In Abb. 3 ist der zeitliche Verlauf eines Versuches graphisch dargestellt, bei dem 150 mm³

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Band 13b, Heft 7, 1958.

Kohlensäure in verschiedenen Gefäßen entwickelt und von Kalilauge absorbiert wurden. Wie man sieht, dauert die vollständige Absorption der Kohlensäure in dem Gefäß mit dem zylindrischen Einsatz etwa 30 Minuten, in dem Kegelgefäß mit Wanne etwa 7 Minuten, in dem Kastengefäß mit Wanne etwa 5 Minuten.

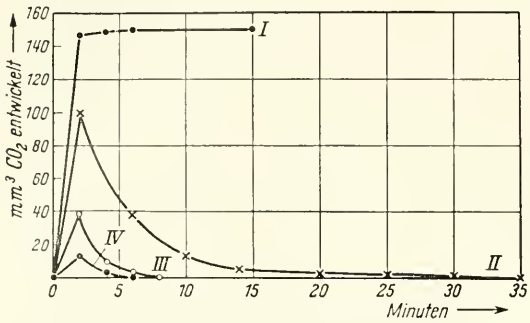


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der CO_2-Absorption durch Kalilauge in verschiedenen Gefäßen bei 20°. Volumen der Gefäße etwa 20 cm³. In den Hauptraum wurden 3 cm³ Na_2CO_3-Lösung gegeben, die 150 mm³ CO_2 enthielten, in die Birne 0,2 cm³ n/1-H_2SO_4, in die Einsätze 0,2 cm³ 20 proz. Kalilauge. Der Gasraum enthielt Luft. Bei t_0 wurde die Säure in das Carbonat gegeben. Kurve I: Kontrolle ohne KOH im Einsatz, zur Bestimmung der entwickelten CO_2. Kurve II: Altes Kegelgefäß, KOH im Einsatz. Kurve III: Neues Kegelgefäß wie Abb. 1, KOH im Einsatz. Kurve IV: Neues Kastengefäß wie Abb. 2, KOH im Einsatz.

Zur Eichung der Wannengefäße gibt man in den Hauptraum etwa 10 μMole H_2O_2, gelöst in 3 cm³ n/10-Schwefelsäure, in die Birne 0,2 cm³ n/1-$KMnO_4$ und entwickelt bei t_0 durch Einkippen des überschüssigen Permanganats den Sauerstoff des H_2O_2 (1 Mol. O_2 aus 1 Mol. H_2O_2). Der Gasraum enthält dabei Luft. Der Einkippdruck des Permanganats wird durch ein Gefäß ohne H_2O_2 ermittelt, der genaue O_2-Wert des H_2O_2 mit Hilfe eines einsatzlosen Kegels, der vorher mit Quecksilber geeicht worden ist. Es wird nicht empfohlen, die Wannengefäße mit Quecksilber zu eichen.

II. Röntgenstrahlen-Dosimetrie

Zur Dosimetrie der Röntgenstrahlen mit Ferrosulfatlösungen[1] benutzen wir Glasgefäße nach Abb. 4, deren Volumen etwa 10 cm³ beträgt und deren Besonderheit darin besteht, daß ihr Boden nur etwa 0,2 mm stark ist. Die Durchlässigkeit dieses dünnen Glasbodens ist hinreichend groß, auch für verhältnismäßig lange Wellen. Zum Beispiel fanden wir für die Bremsstrahlung eines Müllerschen RT 100-Geräts mit Wolframanode die in Tab. 1 angeführten Durchlässigkeiten durch die Mitte des Bodens:

Tab. 1. Durchlässigkeit des Gefäßbodens für Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlängen.

Spannung [KV]	Stromstärke [mA]	Alumin.-Filter [mm]	Durchlässigkeit des Glasbodens
100	8	1,7	0,92
70	10	1,25	0,90
55	10	0,78	0,83
45	10	0,55	0,72
30	10	0,3	0,50
20	10	0,15	0,32

Der Glasboden der Gefäße wird nach den Rändern zu etwas dicker. Doch entstehen hierdurch keine Fehler, wenn für die Dosimetrie und den biologischen Versuch dasselbe Gefäß verwendet wird.

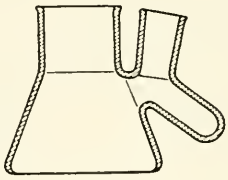


Abb. 4. Gefäß zur Röntgenstrahlen-Dosimetrie, Bodendicke ca. 0,2 mm, Volumen ca. 10 cm^3.

Wegen des dünnen Gefäßbodens eichen wir die Gefäße nicht mit Quecksilber, sondern, wie oben beschrieben, mit H_2O_2 und Permanganat.

III. 2-Gefäßmethode

Da die 2-Gefäßmethode zur Zeit die einzige Methode ist, mit der die Energieprobleme der Zellphysiologie gelöst werden können, so ist jede Verbesserung der Methode von großer Bedeutung. In Abb. 5 ist ein altes Gefäßpaar, in Abb. 6 ein neues Gefäßpaar abgebildet. Es war früher nicht möglich, das kleine Gefäß

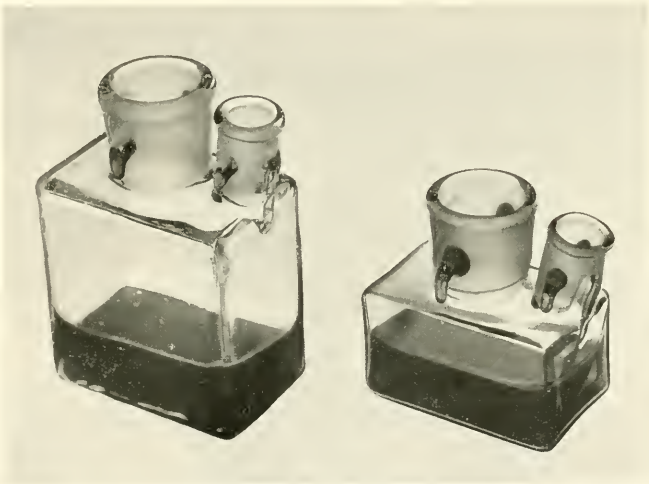


Abb. 5. Altes Gefäßpaar.

während der Gasdurchleitung in der Ausgleichszeit hinreichend schnell zu schütteln, da dann Flüssigkeit an den Kapillarstopfen anschlug und von dem strömenden Gas durch den offenen Kapillarstopfen nach außen gedrückt wurde. Bringt man aber Birnen wie in Abb. 6 an, so ist ein Herausdrücken von Flüssigkeit während der Gasdurchleitung nicht möglich, falls die Birnen im richtigen Winkel angesetzt sind. Dann läuft während des Schüttelns niemals Flüssigkeit aus dem Hauptraum in die Birnen, und es kann *während* der Gasdurchleitung hinreichend schnell geschüttelt werden, d. h. mit einer Frequenz von 200 pro Minute mit einer Exkursion von 0,5 cm nach jeder Seite.

Abb. 6. Neues Gefäßpaar. Volumen ca. 30 und 18 cm³, eingefüllte Flüssigkeit 7 cm³. Man beachte den Ansatzwinkel sowie den Durchmesser des Verbindungsrohrs der Birnen.

IV. Retention der Kohlensäure

Da der Stoffwechsel der Körperzellen in Serum entscheidend verschieden ist von dem Stoffwechsel der Körperzellen in Salzlösungen, wie Ringer-, Tyrode-, Krebsringerlösung usw., so kann der normale Stoffwechsel der Körperzellen nur in

Abb. 7. Gefäß zur Bestimmung der Retention der Kohlensäure. Volumen ca. 25 cm³, einzufüllende Flüssigkeit 7 cm³.

Serum (das mit einigen Volumprozenten Kohlensäure gesättigt ist) gemessen werden. Da ferner Serum Kohlensäure nicht nur physikalisch löst, sondern auch dissoziierend chemisch bindet, gehört zu jeder Stoffwechselmessung von Körperzellen eine Bestimmung der „Retention" der Kohlensäure für denjenigen Kohlen-

säuredruck, bei dem der Stoffwechsel gemessen werden soll. Unsere früheren Vorschriften zur Bestimmung der Retention, insbesondere die damit verbundenen etwas umständlichen Rechnungen haben bewirkt, daß der Mediziner im allgemeinen noch heute Salzlösungen und Kalilauge im Einsatz vorzieht und somit nicht den normalen Stoffwechsel mißt, sondern nur Stoffwechsel-Artefakte.

Dem abzuhelfen, sind Gefäße nach Abb. 7 geeignet, die mit Doppelbirnen versehen sind, deren beide Teile einen Tubus tragen. Der Hauptraum enthält 7 cm^3 Serum, die *eine* Birne enthält Bicarbonat, die *andere* überschüssige Schwefelsäure, der Gasraum enthält den beim biologischen Versuch herrschenden CO_2-Druck, in der Regel 2,5 bis 5 Vol.-Prozent. Die Zunahme des CO_2-Drucks im Gefäß, nach Mischen des Bicarbonats mit der Schwefelsäure, ergibt dann, *fast ohne Rechnung*, die Retention der Kohlensäure[2].

V. Prüfung der 2-Gefäßmethode

Das in Abb. 6 dargestellte Gefäßpaar ist wegen der angesetzten Birnen auch zur Prüfung der 2-Gefäßmethode besonders geeignet.

Sind bei gleicher Füllung der Gefäße die beobachteten Druckänderungen in den beiden Gefäßen H und H', so ergeben die Gasgesetze:

$$\begin{aligned} H &= h_{O_2} + h_{CO_2} \\ H' &= h'_{O_2} + h'_{CO_2}, \end{aligned} \qquad [1]$$

wo h_{O_2} und h_{CO_2} die Änderungen der Partialdrucke des Sauerstoffs und der Kohlensäure sind.

Bedeuten ferner x_{O_2} und x_{CO_2} den Umsatz des O_2 und der CO_2 und k_{O_2} und k_{CO_2} die einfachen Gefäßkonstanten für O_2 und CO_2, so ist

$$\begin{aligned} x_{O_2} &= h_{O_2} \cdot k_{O_2} = h'_{O_2} \cdot k'_{O_2}; \\ x_{CO_2} &= h_{CO_2} \cdot k_{CO_2} = h'_{CO_2} \cdot k'_{CO_2} \end{aligned} \qquad [2]$$

und durch Einsetzen von [2] in [1]

$$H = \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}} + \frac{x_{CO_2}}{k_{CO_2}}$$

$$H' = \frac{x_{O_2}}{k'_{O_2}} + \frac{x_{CO_2}}{k'_{CO_2}}$$

zwei Gleichungen, aus denen x_{O_2} und x_{CO_2} berechnet werden können, da H und H' durch Beobachtung und k_{O_2} und k_{CO_2} durch die Eichung der Gefäße, die eingefüllten Volumina und die Temperatur gegeben sind.

Läßt man in dem Gefäßpaar nur *ein* Gas entstehen, z. B. Kohlensäure, indem man aus den Birnen Säure in Bicarbonat einkippt, so muß der Versuch $x_{O_2} = 0$ ergeben; läßt man nur Sauerstoff entstehen, indem man aus den Birnen z. B. Katalase in Wasserstoffperoxyd einkippt, so muß der Versuch $x_{CO_2} = 0$ ergeben. Mit diesen beiden einfachen Kontrollen, bei denen immer die Einkippdrucke abzuziehen sind, kann man sich überzeugen, daß die Eichung der Gefäße stimmt; daß die Retention der Kohlensäure stimmt; daß man richtig gerechnet hat; und daß die Methode, bei hinreichend großen Druckänderungen, genauer ist als die meisten biologischen Probleme es erfordern.

Literatur

1 Warburg, O., Schröder, W., Gewitz, H., und Völker, W., Naturwissenschaften 45 (1958), 192.

2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforschg. 11b (1956), 657; 12b (1957), 115.

41 Weiterentwicklung[1] der manometrischen Methoden*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Das Prinzip der zentral eingebauten Wanne wird zur Weiterentwicklung der Manometrie ausgenutzt.

Wie in Abb. 1 veranschaulicht[2], verbinden wir die Wanne mit einer Birne, geben in den Hauptraum die Zellsuspension und in die Wanne und Birne je 0,2 cm^3 neutraler Lösungen von $KMnO_4$ und $K_4Fe(CN)_6$, die beim Mischen KOH erzeugen:
$KMnO_4 + 3\ K_4Fe(CN)_6 = MnO_2 + 3\ K_3Fe(CN)_6 + 2\ K_2O$.

Abb. 1. Manometriegefäß zur Bestimmung des Umsatzes der CO_2 und des O_2 in *einem* Gefäß. Volumen 20 cm^3.

$KMnO_4$ ist bereits früher von Krebs[3] für derartige Zwecke empfohlen worden in Verbindung mit dem Reduktionsmittel NaJ, das jedoch wegen der Hypojodid-Bildung Nachteile hat. Die in Abb. 1 abgebildeten Gefäße haben gegenüber Gefäßen, die ich früher Dickens[4] zur CO_2-Bestimmung vorgeschlagen habe, den Vorzug, daß der ganze Boden des Hauptraums für die Zellsuspensionen zur Verfügung steht und das Alkali nicht in einem Ring am Boden, sondern — viel wirksamer — zentral im Gefäß bewegt wird.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, Band 14b, Heft 8/9, 1959.

Mischt man die Lösungen in Birne und Wanne zur Zeit t, so erhält man den Partialdruck der Kohlensäure in dem Gefäß zur Zeit t; und hat man auf die gleiche Weise den Partialdruck der Kohlensäure zur Zeit t_0 bestimmt, so hat man die Änderung des CO_2-Partialdruckes h_{CO_2} in der Zeit $t—t_0$ und kann daraus den Umsatz der CO_2 und des O_2 für die Zeit $t—t_0$ berechnen:

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2},$$
$$x_{O_2} = (H - h_{CO_2}) \cdot k_{O_2},$$
$$H = h_{CO_2} + h_{O_2} \text{ in der Zeit } t - t_0,$$

wo k_{CO_2} und k_{O_2} die Gefäßkonstanten für CO_2 und O_2 bedeuten.

Die Mengen an Reagenzien, die wir einfüllen, betragen im allgemeinen 2,6 mg $KMnO_4$ in 0,2 cm³ H_2O = 16,7 μMole in der Wanne; und 21 mg $K_4Fe(CN)_6$ in 0,2 cm³ H_2O = 50 μMole in der Birne. Diese Mengen reichen zur Absorption von mehr als 1000 mm³ CO_2. Sind die CO_2-Mengen erheblich größer, so erhöht man die Mengen der Reagenzien entsprechend.

Als manometrische Sperrflüssigkeit benutzen wir Brodiesche Lösung bis zu CO_2-Drucken von 200 mm Brodie, für höhere CO_2-Drucke hat sich Quecksilber bewährt, bei Kapillaren-Durchmessern von 0,8 bis 1 mm. Natürlich muß man den Umsatz der CO_2 und des O_2 durch Variation der Zellmengen und der Versuchszeiten immer so wählen, daß die Ausschläge an Millimetern Brodie oder an Millimetern Quecksilber hinreichend groß werden.

Sind aber die Partialdrucke der CO_2 im Gefäß zu groß und sind die Partialdrucke des Sauerstoffs klein, so ist es oft zweckmäßig, an Stelle der CO_2 den O_2 zu bestimmen[1], indem man in die Wanne 0,4 cm³ Wasser gibt, in die Birne 20 mg trockene $Na_2S_2O_4$ und 20 mg trockenes $CaCl_2$.* Gibt man dann die Salze in die Wanne, so beginnt sofort die O_2-Absorption

$$O_2 + Na_2S_2O_4 = Na_2SO_4 + SO_2$$

und man erhält direkt h_{O_2}, indirekt $h_{CO_2} = H - h_{O_2}$.

Enthält der Hauptraum der Manometriegefäße atmende Zellen, so geht nach dem Mischen von Wanne und Birne die Atmung weiter. Dabei wird die Atmungs-CO_2 in dem Maße, als sie von den Zellen in den Gasraum abgegeben wird, von der KOH in der Wanne absorbiert und erzeugt also keinen Druck. Dagegen erzeugt der O_2-Verbrauch der Atmung einen negativen Druck, der als Korrektion bei der CO_2-Bestimmung berücksichtigt werden muß.

Hat man z. B. im Hauptraum des Manometriegefäßes 50 mm³ *Chlorella* und im Gasraum einen CO_2-Partialdruck von 200 mm Brodie, so findet man:

Druckänderung nach dem Mischen von Wanne und Birne

	[mm]
Endwert 10′ nach dem Mischen	— 206
Druckänderung in weiteren 5′ infolge von Atmung	— 3
Druckänderung in weiteren 5′ infolge von Atmung	— 3
Also CO_2-Partialdruck im Gefäß zur Zeit des Mischens	+ 200

* *Zusatz 1961.* Statt $Na_2S_2O_4 + CaCl_2$ benutzen wir heute trockenes $CrCl_2 + CaCl_2$ und geben beide diese Salze in die Wanne, die 0,4 cm³ Wasser enthält. $Na_2S_2O_4$ hat den Nachteil, daß es SO_2 entwickelt bei der Oxydation.

Bestimmung von gebundener und freier CO_2

Enthält die Zellsuspension Bicarbonat, so zerfällt nach dem Mischen des Inhalts von Wanne und Birne durch die Fortnahme des CO_2-Drucks das Bicarbonat gemäß der Gleichung:

$$2\,NaHCO_3 = Na_2CO_3 + H_2O + CO_2,$$

das heißt, man hat nunmehr einen langsamen Strom von CO_2 aus der Zellsuspension in die Wanne, mit der Folge, daß sich der manometrische Endwert nur „kriechend" einstellt. In solchen Fällen benutzen wir Gefäße nach Abb. 2, die außer der mit der Wanne verbundenen Birne noch eine zweite Birne tragen, die mit dem Hauptraum verbunden ist. Gibt man zur Zeit t aus der zweiten Birne überschüssige Schwefelsäure in den Hauptraum, so erhält man das Bicarbonat im Gefäß zur Zeit t; und mischt man dann Wanne und Birne, so erhält man die gesamte im Gefäß vorhandene CO_2 und aus der Differenz von gesamter und gebundener CO_2 die im Gefäß vorhandene freie CO_2.

Abb. 2. Manometriegefäß zur Messung der gebundenen und der freien Kohlensäure. Volumen 20 cm³.

Anmerkungen

1. Die Gefäße nach Abb. 1 eignen sich auch zur Bestimmung der „Retention" der Kohlensäure, d. h. zur Bestimmung der Kohlensäure, die als Bicarbonat gebunden wird, wenn man den Druck der Kohlensäure erhöht. Wir bringen zu dem Zweck in den Hauptraum 3 cm³ H_2O oder 3 cm³

der retinierenden Flüssigkeit (z. B. Eiweißlösung, Phosphatlösung), in die Wanne etwa 10 μMole $NaHCO_3$, gelöst in 0,4 cm^3 Wasser, in die Birne etwa 20 mg $KHSO_4$ (= etwa 150 μMole), in den Gasraum so viel Kohlensäure, wie bei dem Versuch mit den Zellen vorhanden ist. Wird dann das $KHSO_4$ (das nicht in H_2O gelöst ist, um Einkippdrucke zu vermeiden) in die Wanne gegeben, so wird aus der Wanne CO_2 entwickelt. Von dieser CO_2 absorbiert das Wasser CO_2 nur physikalisch, die retinierende Flüssigkeit aber chemisch, die Differenz ist die chemiseh gebundene CO_2, die dividiert durch den Druckzuwachs und das Flüssigkeitsvolumen die Retention R ergibt. Die Methode ist der Anordnung mit der siamesischen Birne vorzuziehen, weil hier die CO_2-Entwicklung im Hauptraum erfolgt und sich deshalb die Gleichgewichte schneller einstellen.

2. Enthält der Gasraum *Kohlenoxyd*, so werden unter unseren Versuchsbedingungen merkliche Mengen CO von dem in der Wanne gelösten $KMnO_4$ oxydiert, wie Herr DETLEV KAYSER beobachtet hat. Man vermeidet den hierdurch bedingten Fehler, indem man das $KMnO_4$ nicht gelöst, sondern in festem Zustand in die Wanne bringt und das $K_4Fe(CN)_6$ in der Birne nicht in 0,2, sondern in 0,4 cm^3 Wasser löst. Gibt man dann zur Zeit t das Ferrocyanid in die Wanne, so wird das $KMnO_4$ in dem Maße, als es gelöst wird, reduziert und kann also kein CO oxydieren.

3. Bei Versuchen mit *Blausäure* destilliert nach dem Mischen von Wanne und Birne Blausäure aus der Zellsuspension in die Wanne, doch ist der sich dabei herausbildende Druck der Blausäure so klein, daß die Manometrie nicht gestört wird.

4. Bei Versuchen mit *Licht* muß man wissen, daß Ferrocyanid im Licht zu Ferricyanid oxydiert und dabei alkalisch wird. Wir geben deshalb das Ferrocyanid nicht in die Wanne, sondern in die Birne, wo es im allgemeinen von dem Lichtstrahl nicht getroffen wird. Arbeitet man aber in diffusem Licht, so umhüllt man die Birne mit Metallfolie. — Wird die $KMnO_4$-Lösung in der Wanne von Licht getroffen, so wird sie infolge der Licht-Absorption warm, um so mehr, weil die Wanne von Luft umgeben ist, die die Wärme langsam ableitet. Hier tritt also bei den Übergängen dunkel—hell und hell—dunkel ein *thermomanometrischer* Effekt auf, den man eliminiert, indem man die ersten 5 Min. nach dem Wechsel nicht abliest.

Literatur

1 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Liebigs Ann. Chem. 604 (1957), 94; Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.
2 Zum Musterschutz angemeldet.
3 KREBS, H. A., Biochem. Z. 220 (1929), 250.
4 DICKENS, F., und SIMER, Biochem. J. 24 (1930), 905 und 1301; 25 (1931), 973 und 985; 26 (1932), 90.

42 Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Carbonatgemische)*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Mit Hilfe neuer Manometriegefäße ist es möglich geworden, die Zellsuspensionen räumlich von den Carbonatgemischen zu trennen und den Druckbereich der CO_2, den die Gemische konstant halten, auszudehnen auf ein Gebiet von etwa 0,28 bis 600 mm Wasser. Unter den Anwendungen ist eine sehr einfache 1-Gefäß-Methode zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese besonders hervorzuheben; ferner die Bestimmung des CO_2-Drucks, der zum Ablauf der Chinon- und Ferricyanidreaktionen in den grünen Grana notwendig ist.

Die Bicarbonat-Carbonatgemische, die durch das Gleichgewicht

$$\frac{NaHCO_3^2}{Na_2CO_3 \cdot CO_2} = K$$

den Kohlensäuredruck konstant halten, sind bisher in der Weise angewendet worden[1], daß die Zellen, z. B. *Chlorella*, in den Gemischen suspendiert wurden. Alle Druckänderungen in den Manometriegefäßen waren dann nur Änderungen des O_2-Druckes und die Aufnahme oder Entwicklung von O_2 konnte mit den

Abb. 1. Gesamtvolumen ca. 40 cm³. Anhängervolumen ca. 15 cm³. Hauptraum: 3 cm³ Zellsuspension. Anhänger: 3 cm³ Bicarb.-Carb.-Gemisch + 2 mg Cartase. Gasraum: Argon oder Luft.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, Band 15b, (1960): 364.

Zusatz 1961. Die in dieser Arbeit angegebenen Kohlensäuredrucke über den konzentrierten Carbonatgemischen waren nicht korrekt bestimmt, worauf uns Dr. Dean Burk, Bethesda/Maryland, aufmerksam machte. In Beitrag 79 ist eine neue und korrekte Methode zur Bestimmung der Kohlensäuredrucke beschrieben.

einfachen Gefäßkonstanten berechnet werden. Der Nachteil war, daß die Gemische die Zellen schädigten.

Wir haben nunmehr diesen Nachteil dadurch behoben, daß wir die Zellen und die Bicarbonat-Carbonatgemische räumlich voneinander trennen in Manometriegefäßen, deren Form die Abb. 1 zeigt. Die Zellen befinden sich im Hauptraum in ihrem physiologischen Medium, z. B. *Chlorella* in ihrem sauren Kulturmedium bei pH 4,3; während die Gemische sich im Anhänger befinden und nunmehr beliebig konzentriert und alkalisch sein dürfen.

Es ist ein wesentliches Erfordernis der neuen Methode, daß den Carbonatgemischen im Anhänger das Ferment zugesetzt wird, das die Hydratisierung und Dehydratisierung der Kohlensäure katalysiert und das früher nicht zugesetzt werden mußte, wenn die Zellen mit den Carbonatgemischen in Berührung waren.

Molarität [Mole/*l*]	Gemisch $\frac{cm^3 \text{ Bicarbonat}}{cm^3 \text{ Carbonat}}$	Gleichgewichtsdruck der CO_2 bei 20° C [mm Brodie]	Retention $\frac{mm^3}{mm \cdot cm^3}$
0,1	85/15	22,00	9,6
0,2	15/85	0,28	∞
0,2	25/75	0,88	∞
0,2	50/50	5,24	103
0,2	65/35	12,40	50,7
0,2	75/25	23,00	24,4
0,2	85/15	49,00	13,7
0,2	90/10	82,00	8,7
0,2	95/5	178,00	3,5
2,0	30/70	19,5	∞
2,0	50/50	55,0	71,3
2,0	65/35	114,0	35
2,0	75/25	231,0	13,5
2,0	85/15	448,0	6,2
3,0	75/25	306,0	24,7
3,0	85/15	612,0	9,86

Tab. 1. CO_2-Druck und Retention in Bicarbonat-Carbonat-Gemischen.

2 mg „Cartase" der Schering A.G., zu 3 cm³ Carbonatgemisch zugesetzt, hat sich dabei als eine ausreichende Menge erwiesen.

Die 0,1 und 0,2-*m*. Gemische waren Gemische der Natriumsalze; die 2,0 und 3,0-*m*. Gemische waren Kaliumsalze. Die CO_2-Gleichgewichtsdrucke für die 0,1 und 0,2-*m*. Gemische wurden nach Auerbach und Pick (Arbeiten aus dem Gesundheitsamt 38, 274 [1911]) berechnet; die CO_2-Gleichgewichtsdrucke für die 2,0 und 3,0-*m*. Gemische wurden, wie im folgenden beschrieben, gemessen.

Tab. 1 gibt einen Überblick über die von uns verwendeten Carbonatgemische. Wie man sieht, können wir nunmehr den Kohlensäuredruck von 0,28 bis 612 mm Brodie (10000 mm Brodie = 1 Atmosphäre), also um das 2200fache variieren, meistens mit ausreichender Retention, wie im folgenden näher begründet werden wird.

Wir haben die Gemische kleinen Kohlensäuredrucks benutzt, um die kleinen Kohlensäuredrucke zu messen, deren die Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen in

den grünen Grana bedürfen; und wir haben das Gemisch, das die großen Kohlensäuredrucke von 300 bis 600 mm Brodie konstant hält, benutzt, um eine 1-Gefäßmethode zu entwickeln, mit der der Quantenbedarf der CO_2-Spaltung nunmehr in einfachster Weise gemessen werden kann. Über beide Anwendungen werden wir in folgenden Mitteilungen berichten.

Ferner hat Herr ARNOLD LEHMANN die Carbonatgemische benutzt, um die Photosynthese von Blättern bei variierten Kohlensäuredrucken zu messen. Das Blatt, dessen Lichtabsorption in unsrer Ulbrichtschen Kugel[2] gemessen war, stand dabei in einem Manometriegefäß nach Abb. 2, mit dem Stengel in der „Vase", während der Hauptraum 3 cm^3 Carbonatgemische verschiedener Zusammensetzung enthielt. Man erhält dabei viele Stunden lang konstante Druckänderungen, wobei der Kohlensäuredruck variiert werden kann, indem man, ohne das Blatt herauszunehmen, hintereinander verschiedene Carbonatgemische in den Hauptraum einfüllt.

Abb. 2. Manometriegefäß zur Messung der Photosynthese von Blättern. Volumen ca. 30 cm^3. Eine Messung des Quantenbedarfs der Blätter mit Hilfe dieser Methode ist im Gange.

Messung der Kohlensäure-Gleichgewichtsdrucke

Zur Messung der Kohlensäure-Gleichgewichtsdrucke wurden Gefäße nach Abb. 1 benutzt, in deren Hauptraum das Bicarbonat und in deren Anhänger das Carbonat fest eingewogen wurden (Vorschlag von KRIPPAHL), während die Birne 2 mg feste Cartase enthielt. Dann wurde auf das Carbonat im Anhänger soviel Wasser gegeben, daß das Gesamtvolumen nach Herstellung des Gemischs 3 cm^3 betrug. Nach Temperaturausgleich im Thermostaten wurde die Carbonatlösung auf das feste Bicarbonat in den Hauptraum gegeben, bis zur Lösung des Bicarbonats geschüttelt und schließlich die Cartase aus der Birne in den Hauptraum gegeben, worauf sich in einigen Min. der Gleichgewichtsdruck der Kohlensäure einstellte, der in der Tabelle angegeben ist.

Messung der Retention der Kohlensäure

Zur Messung der Retention benutzten wir Gefäße nach Abb. 1. In den Hauptraum gaben wir 5 μMole $NaHCO_3$, gelöst in 3 cm^3 Wasser, in die Birne 0,2 cm^3 1-*n*. H_2SO_4, in den Anhänger 3 cm^3

des zu prüfenden Bicarbonat-Carbonatgemischs und 2 mg Cartase, in den Gasraum Argon oder Luft. War im Thermostaten die Temperatur ausgeglichen, so wurde die Schwefelsäure in den Hauptraum gegeben, und es entwickelte sich ein positiver Druck, der bald konstant wurde, wenn der Anhänger 3 cm^3 Wasser enthielt, der aber schnell kleiner wurde, wenn der Anhänger das Carbonat-Gemisch enthielt. Zum Beispiel fanden wir:

Gefäß mit Wasser im Anhänger		Gefäß mit 2,0-*m*. Gemisch 65/35 im Anhänger	
$v = 41{,}25\ cm^3$		$v = 41{,}65\ cm^3$	
$k_{CO_2} = 3{,}814\ mm^2$		$k_{CO_2} = 3{,}854\ mm^2$; korr. 3,80 mm^2 für Löslichkeit im Anhänger	
Druckänderungen nach Einkippen der Säure		→	
5′	+ 28,5	5′	+ 8,5
5′	0	5′	— 6,0
5′	0	5′	— 1,5
5′	0	5′	0
	+ 28,5		+ 1 mm
	= 108,7 $mm^3 CO_2$		= 3,85 $mm^3\ CO_2$

$$R[\text{etention}] = \frac{108{,}7 - 3{,}85}{1 \cdot 3} = 35 \left[\frac{mm^3\ CO_2}{mm \cdot cm^3}\right]$$

das heißt, 1 cm^3 des Gemischs bindet chemisch 35 mm^3 CO_2, wenn der CO_2-Druck um 1 mm steigt.

Auswirkung der Retention auf die Manometrie

Wenn in einem Manometriegefäß nur O_2 entsteht oder verschwindet, so ist

$$x_{O_2} = h \cdot k_{O_2}, \qquad [1]$$

wo h die beobachtete Druckänderung ist.

Wenn außerdem Kohlensäure entsteht oder verschwindet, so ist

$$x_{O_2} = h \cdot \left[\frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma \cdot k_{O_2}}\right] = h \cdot K_{O_2}, \qquad [2]$$

wo groß K_{O_2} die Gefäßkonstante für O_2 für den Fall ist, daß beide Gase entstehen oder verschwinden; und klein k_{CO_2} die Gefäßkonstante für Kohlensäure für den Fall, daß nur CO_2 entsteht oder verschwindet.

Durch die Retention wächst k_{CO_2} der Gl. [2], und zwar um so mehr, je größer R und das Volumen der retinierenden Flüssigkeit v_F wird:

$$k^R_{CO_2} = (k_{CO_2} + v_F\, R), \qquad [3]$$

wo $k^R_{CO_2}$ die Gefäßkonstante für Kohlensäure ist, die der Retention Rechnung trägt.

Je größer $v_F\, R$ wird, um so mehr nähert sich, gemäß Gl. [2], der Wert von groß K_{O_2} dem Wert von klein k_{O_2}. Ist wie in unserm obigen Beispiel

$$k_{CO_2} = 3{,}85, \quad k_{O_2} = 3{,}41, \quad v_F = 3\ cm^3 \quad \text{und} \quad R = 35,$$

so wird Gl. [2] mit $\gamma = -1$

$$x_{O_2} = h \cdot \frac{k^R_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k^R_{CO_2} + \gamma \cdot k_{O_2}} = \frac{(3{,}85 + 3 \cdot 35) \cdot k_{O_2}}{(3{,}85 + 3 \cdot 35) - 1 \cdot 3{,}41},$$

$$x_{O_2} = h \cdot \frac{108{,}9}{105{,}4} \cdot k_{O_2} = h \cdot 1{,}03 \cdot k_{O_2}. \qquad [4]$$

Der Korrektionsfaktor 1,03 für k_{O_2} ändert sich, wenn wir γ verschieden von — 1 annehmen. Aus den Versuchen mit der 2-Gefäßmethode aber weiß man, daß bei der Atmung und Photosynthese von *Chlorella* γ nur zwischen — 0,7 und — 1,3 liegen kann, so daß $\gamma\ k_{O_2}$ nur sein kann

$$2{,}4 \text{ für } \gamma = -0{,}7 \quad \text{oder} \quad 3{,}4 \text{ für } \gamma = -1{,}0$$
$$\text{oder} \quad 4{,}4 \text{ für } \gamma = -1{,}3,$$

daß also der Korrektionsfaktor von k_{O_2} in Gl. [4] nur die Werte haben kann

$$1{,}02 \quad \text{oder} \quad 1{,}03 \quad \text{oder} \quad 1{,}04$$

und daß man nur einen Fehler von 1% machen kann, wenn man $\gamma = -1{,}0$ annimmt.

Für jeden Fall von $v_F\ R$ und k_{CO_2} und k_{O_2} wird man auf diese Weise berechnen, wie groß der Fehler ist, wenn man x_{O_2} mit k_{O_2} statt mit K_{O_2} berechnet, und man wird nötigenfalls, wie in Gl. [4], mit einem korrigierten k_{O_2} rechnen.

Literatur

1 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230; Warburg, O., Geleick H., und Briese, K., Z. Naturforschg. 6b (1951), 285 und 7b (1952), 141.

2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b, (1954), 181.

42a Glutaminsäure-Decarboxylase in Chlorella*

Von Otto Warburg, Helmut Klotzsch und Günther Krippahl

Wir haben gefunden, daß Chlorella eine sehr wirksame Glutaminsäure-Decarboxylase enthält, ein Ferment, das Glutaminsäure anaerob in γ-Amino-Buttersäure und Kohlensäure spaltet. Diese Spaltungsreaktion in Chlorella verhält sich, z. B. gegen Blausäure, so ähnlich der durch Fluorid in Chlorella bewirkten Kohlensäureabspaltung, daß in Betracht gezogen werden muß, daß die „Fluoridreaktion" eine Decarboxylierung von Glutaminsäure ist; daß mit anderen Worten Glutaminsäure, gebunden an Chlorophyll oder Chlorophylloproteid, funktionell im chemischen Mechanismus der Photosynthese ist.

---

* Aus Die Naturwissenschaften 44 (1957): 235.

43 Über das Verhalten einiger Aminosäuren in *Chlorella* bei Zusatz von markierter Kohlensäure*

Von Otto Warburg, Helmut Klotzsch und Günter Krippahl

Die Entdeckung[1], daß Glutaminsäure am Mechanismus der Kohlensäure-Assimilation in *Chlorella* als Katalysator beteiligt ist, veranlaßte uns zu untersuchen, wie lange es dauert, bis bei Belichtung markierte Kohlensäure in denjenigen Aminosäuren erscheint, die in größerer Menge im Hitzeextrakt von *Chlorella* vorkommen: Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin ($\alpha + \beta$).

In einem kegelförmigen Manometriegefäß, in dem sich 100 cm³ *Chlorella* befanden**, wurde mit Hilfe einer siamesischen Birne in Luft ein Druck von 150 mm Wasser an Kohlensäure erzeugt, von der 50 mm $^{14}CO_2$ war. Nachdem 5 Min. im Dunkeln bei Zimmertemperatur bewegt worden war, wurde 0,5 oder 1,0 oder 5,0 Min. mit weißem Licht belichtet. Die absorbierte Lichtintensität war klein; in 5 Min. reagierte das Chlorophyll der *Chlorella* nur zweimal. Ein sonst gleich gefülltes, aber nicht belichtetes Gefäß ergab das Verhalten der *Chlorella* im Dunkeln gegen markierte Kohlensäure.

Sofort nach dem Belichten des einen Gefäßes wurden beide Gefäße 5 Min. in ein Wasserbad von 75° versenkt, um alle Fermentreaktionen zu hemmen. Dann wurde zentrifugiert. Die überstehende Lösung, der „Hitzeextrakt", wurde eingetrocknet, ein aliquoter Teil des Dunkel- und Hell-Extrakts wurde der zweidimensionalen Papierchromatographie mit Phenol-Citrat-Phosphat und mit Butanol-Propionsäure unterworfen. Die aus Tab. 1. ersichtlichen Impulszahlen pro Min. wurden mit dem *Geiger*-Zähler in den Hitzeextrakten von je 10 mm³ *Chlorella* gefunden.

Das Ergebnis ist, daß bereits nach einer halben Min. schwacher Belichtung in Asparaginsäure und Alanin mehr Aktivität gefunden wird als in den Phosphorsäureestern. Was die absoluten Werte anbetrifft, so sei angegeben, daß 1 μMol unseres Kohlensäure-Präparates, eingetrocknet auf Papier, 1,7 Millionen Impulse pro Min. ergab sowie daß die Mengen an Aminosäuren im Hitzeextrakt aus 10 mm³ *Chlorella* von der Größenordnung waren:

		(μMol)
Asparaginsäure	einige	1/100
Alanin	einige	1/10
Glutaminsäure	zwei	1/10

woraus man berechnen kann, daß in 1 μMol Asparaginsäure sehr bald nach der Belichtung 1 μMol $^{14}CO_2$ aufgenommen worden war.

Die Aktivität der Glutaminsäure bleibt bei dieser Versuchsanordnung hinter der Aktivität der Asparaginsäure und des Alanins zurück. Es ist möglich, daß in *Chlorella* eine Kette von Aminosäuren katalytisch wirkt, in der die Glutaminsäure

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 12b (1957): 481.

** Suspendiert in 0,05% $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 0,025% KH_2PO_4, mit H_2SO_4 auf p_H 3,8.

Tab. 1. Impulszahlen pro Minute der Hitzeextrakte pro mm^3 *Chlorella*.

Aminosäuren	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel	hell
	10′ d 0,5′ d	10′ d 0,5′ h	5′ d 1′ d	5′ d 1′ h	5′ d 5′ d	5′ d 5′ h
Asparaginsäure	8 520	18 750	9 320	14 205	8 000	30 100
Glutaminsäure	1 136	1 614	1 096	1 900	3 350	17 000
Alanin	710	6 950	940	19 000	817	37 500
Phosphorylierte Zucker und Glycerinsäure	95	3 451	147	9 800	523	23 800
Nicht phosphorylierte Zucker	nicht bestimmt	nicht bestimmt	143	113	857	2 726

nicht an erster Stelle steht. Auch muß man bedenken, daß der chemische Mechanismus der Glutaminsäure-Katalyse noch unbekannt ist und daß wir bisher nur wissen, daß die Lichtwirkung beim Verschwinden und Entstehen der Glutaminsäure in lebender *Chlorella* verschwindet und wieder erscheint.

Die für diese Versuche verwendeten *Chlorella*-Kulturen waren 2tägige Südfensterkulturen unter Zusatz von 200 W Metallfadenlicht. Die Einsaat betrug 60 mm^3 Zellen in 250 cm^3 Kulturlösung, die Ernte ca. 700 mm^3 Zellen.

Herrn Arthur L. Schade (National Institute of Health, Bethesda) danken wir für die Unterweisung in den Methoden der Arbeiten mit ^{14}C.

Literatur

1 Warburg, O., Klotzsch, H., u. Krippahl, G., Naturwissenschaften 44 (1957), 235; Z.Naturforschg. 12b, (1957), 266.

44 Photosynthesis*

Von Otto Warburg

Ever since *Chlorella* has been an object of photosynthetic study, it has been known that there are cells that use light efficiently and cells that use light inefficiently. In recent years we have sought to discover and control the conditions that give rise to efficient cells. It has been found that one of the most important conditions is the light intensity at which the cells are cultured. If one employs artificial light sources without interruption, as has been the almost universal practice, the *Chlorella* are then too far removed from their natural living conditions of the past half billion years. The cells are forced to produce organic matter continuously, and more material than they need for their own synthesis. As a consequence, the energy yield of the cells is reduced to a small fraction of the optimum yield.

Cells that use light efficiently result, on the other hand, when one allows the intensity of the light to fluctuate so as to imitate day and night, with dimming late evening and early morning[1]. We attain this by varying the operating voltage automatically from 50 up to 220 volts and back to 50 volts again over a period of 24 hours. The relative quantum intensities of radiation were measured with the chemical quantum actinometer[2], with results indicated by the ordinate values in Fig. 1. Cells so cultured use the light best when they are placed in the manometric vessels in the morning and their photosynthetic efficiency is measured thereafter during the artificial day.

Equally as important as the culturing of the cells are the conditions under which the utilization of the light is measured. For example, it was found with monochromatic light that the utilization of light in the green or yellow or red was the poorer the purer the spectral composition. However, good utilization was immediatly restored when a relatively small amount of blue-green light was added to the main beam of very pure monochromatic light. One can thus obtain good or poor yields at will, simply by adding or removing the blue-green light during the measurements of efficiency. If each such test period is made 30 minutes long, one can observe in an experimental day of 8 hours, with one and the same suspension, good yields eight times and poor yields eight times!

The different parts of the blue-green spectrum are not equally effective. The action spectrum of the blue-green light shows a sharp maximum in the region of 460 mμ, as is shown in Fig. 2. This action spectrum is probably a carotinoid spectrum. An inactive carotinoid proenzyme is probably converted by the blue-green light into an active lumino enzyme. As possible analogs, there may be mentioned light-sensitive visual purple, and ooverdin, a carotinoid protein discovered by Richard Kuhn.

Both examples—the fluctuating light during culture and the blue-green light during yield measurement—suffice to make it understandable why, in the last

---

* Aus: Science, 128, (1958): 68—73.

40 years, in different institutes throughout the world, very different photosynthetic yields have been found—different not in percentages, but in hundreds of percent. Even if the manometry and the light measurements had been correct everywhere, not even approximate agreement would have been possible, owing to ignorance of the essential conditions of culture and measurement. Thus, in the United States, during the years 1938 to 1948, an average quantum requirement of 16 per molecule of oxygen gas produced was found, corresponding to an energy yield of 18 percent in red light. This value is removed from the optimal value[1] by several hundred percent.

If one maintains the now-established conditions of good yield, one will obtain good yields from now on, everywhere and always. Figure 3 shows an example of oxygen evolution during constant illumination in a 5-hour experiment in which the quantum requirement per molecule of O_2 produced was approximately 3 for the entire period. Any deviation from linearity with time was within the experimental error. Figure 4 shows oxygen development in a 6-hour experiment in which the quantum requirement per molecule of O_2 produced was approximately 4. Table 1 contains the results of 23 six-hour experiments conducted on 23 days of the months March to May, 1957, in which only a single instance of a poor yield, namely a quantum requirement of 7.5, was obtained[3].

The quantum requirement of 3 per molecule of O_2 signifies that in red light about 90 percent of the incident light energy can be converted into chemical energy. Since light energy is freely transformable energy, this energy efficiency is completely compatible with both the first and second laws of thermodynamics. Thermodynamically incompatible with good yields were only those theories concerning the chemical mechanism of photosynthesis that are today at long last recognized as incorrect.

In summary, one can say that, with the fixing of the conditions of culture and measurement, the dispute concerning the efficiency of utilization of sunlight is finally decided. It is a decision in favor of nature. The reaction by which nature transforms the energy of sunlight into chemical energy, and upon which the existence of the organic world is based, is not so imperfect that the greater part of the applied light energy is lost; on the contrary, the reaction is, like the world itself, nearly perfect.

The Multiquanta Problem

But how is it possible that carbonic acid can be split by the light quanta of visible light, which are so deficient in energy that several quanta are necessary? In the photochemistry of the inanimate world, no reactions are known in which several quanta react with *one* molecule at one time, and, moreover, several-quanta reactions are theoretically scarcely conceivable.

The problem was solved several years ago at Dahlem by Dean Burk and us[4]. By measuring photosynthesis under special conditions, a splitting of photosynthesis into two reactions was observed: a *light reaction and a dark reaction*. Normally these two reactions overlap each other so that one cannot observe each one separately.

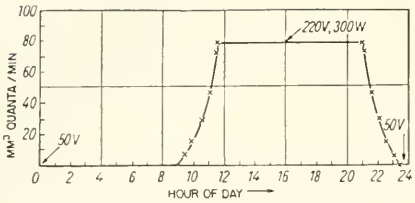


Fig. 1. Fluctuating light intensity in the culturing of *Chlorella*.

In the light reaction, one molecule of O_2 will develop per molecule of chlorophyll, with, however, a quantum requirement, not of 3, but of 1. This at first appears to contradict the laws of energy. However, during the dark period following the end of illumination it can be observed manometrically, under suitable conditions, that two-thirds of the oxygen gas develop during the light period undergoes

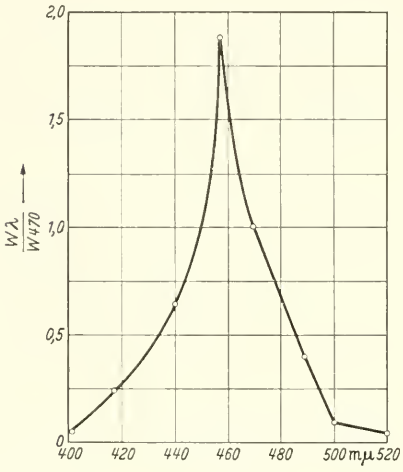


Fig. 2. Action spectrum of blue-green light.

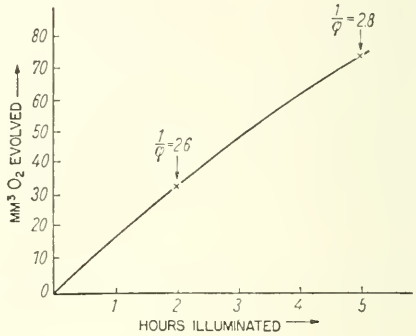


Fig. 3. Oxygen gas produced at constant illumination with green light with a small quantity of blue-green light added (five-hour experiment).

a back reaction, with restoration of the original condition wherein light can again produce O_2 as before[5]. Thus, if the light reaction is not considered by itself, but together with the dark reaction, all is in order energetically.

Closer study showed that in the dark reaction the oxygen of carbonic acid was so loosened that, with the help of the energy of respiration, one quantum then sufficed to produce one molecule of O_2. The carbonic acid derivative with the loosened oxygen is probably a peroxide. In order not to go beyond the facts, we may call it the "photolyte" of photosynthesis.

If we write the light and dark reactions of photosynthesis one after the other, we obtain (Chl, chlorophyll):

$$\text{(Light)}\quad 3(\mathrm{ChlCO_2}^{\star}) + 3\mathrm{N_0}h\nu + 3\mathrm{CO_2} \rightarrow 3(\mathrm{ChlCO_2}) + 3\mathrm{C} + 3\mathrm{O_2} \qquad [1]$$

$$\text{(Dark)}\quad 2\mathrm{C} + 2\mathrm{O_2} \rightarrow 2\mathrm{CO_2} + 200{,}000\ \mathrm{cal} \qquad [2]$$

$$\text{(Dark)}\quad 3(\mathrm{ChlCO_2}) \rightarrow 3(\mathrm{ChlCO_2}^{\star}) - 200{,}000\ \mathrm{cal} \qquad [3]$$

$$\text{(Balance)}\quad 1\mathrm{CO_2} + 3\mathrm{N_0}h\nu \rightarrow 1\mathrm{C} + 1\mathrm{O_2}$$

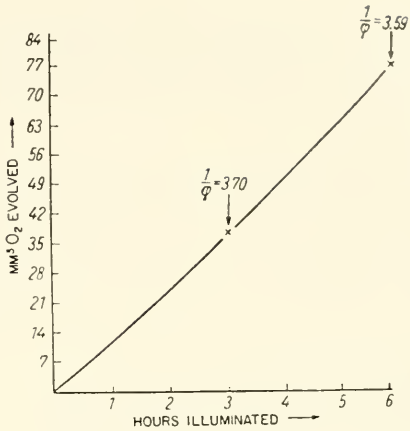


Fig. 4. Oxygen gas produced at constant illumination with green light with a small quantity of blue-green light added (six-hour experiment).

The photolyte derivative of carbonic acid is designated by an asterisk, in order to distinguish it from the untransformed carbonic acid. Nothing in this reaction sequence is theory. All has been found experimentally and measured in *living*

Table 1. Quantum requirement in 23 consecutive experiments (mole quanta absorbed by chlorophyll/mole O_2 developed).

Date (1957)	Quantum requirement	Date (1957)	Quantum requirement
Mar. 1	4.10	Apr. 1	3.49
3	3.68	3	4.75
5	3.65	9	4.26
6	3.58	10	4.65
7	4.30	11	4.30
14	3.65	15	7.51*
21	4.10	17	3.92
22	3.22	23	3.54
25	4.61	24	2.92
27	3.90	25	3.20
29	3.56	26	4.62
		May 1	3.90

* This was the single instance of a poor yield.

Chlorella. Reaction 1, the *light reaction*, is measured by the O_2 development and CO_2 consumption in the light. Reaction 2 is measured by the O_2 consumption and CO_2 production in the dark. Reaction 3, in which the bound, inactive carbonic acid is transformed into the photolyte, is measured by the time that elapses until the light is again able to develop as much O_2 as in reaction 1. In our experimental arrangement this recovery period for full light action lasted about 20 minutes, and could therefore be followed very accurately in its time course.

The photolyte is written as a chlorophyll compound because the quantity of O_2 that the light can develop from the photolyte is equivalent to the chlorophyll content of the cells[6]. This is important. We now no longer have any need to wonder how it is possible that the light energy is transferred without loss from the chloro-

phyll molecule to the photolyte molecule, since we now know that the light acts within the same molecule that absorbs it. The light reaction of photosynthesis is thus nothing else than the photodissociation of a pigment, comparable to the photodissociation of carbon monoxide-hemin compounds, and the quantum yield of 1 is almost self-evident.

Upon adding the three equations of the reaction sequence, the photolyte is eliminated, and the net result is the splitting of carbonic acid by 3 quanta of light, which is what one finds experimentally in the balance of photosynthesis.

Nothing seems to be simpler than this solution of the quantum problem. Of the 110,000 calories that are necessary for the splitting of 1 mole of carbonic acid,

Fig. 5. Vessel for demonstration of the necessity of respiration for photosynthesis.

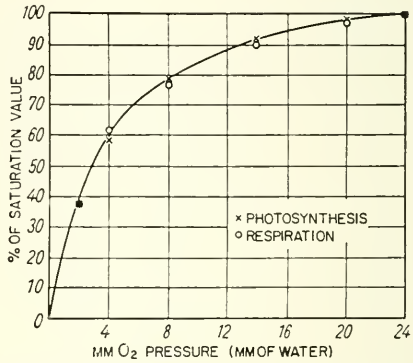


Fig. 6. Respiration and photosynthesis at low pressures of O_2.

70,000 are provided by a respiratory process. The remaining 40,000 calories that the light provides is exactly the amount of energy of 1 mole quanta of red light. All quantum difficulties are thus eliminated.

In order fully to appreciate this solution, one must reflect that in photosynthesis no energy would be gained, but rather lost, if the energy of the respiratory process were taken from the energy store of the cells. Only because the respiratory energy of reaction 2 is directly supplied by light is a net gain of energy attained. All detail is simple physics and chemistry. But the whole is a higher kind of physics and chemistry, devised by the genius of living nature.

To conclude the discussion of energetics, I would like to describe an experiment that ought to be demonstrated to all students of biochemistry, because it confirms in the simplest possible way the requirement of our equations that there is no photosynthesis without respiration.

Figure 5 shows the experimental vessel that is to be attached to a manometer.

The vessel contains *Chlorella* suspended in a carbonate-bicarbonate mixture that maintains the CO_2 pressure constant, so that pressure changes registered by the manometer can only be changes in O_2 pressure. The gas space contains argon and a very little oxygen.

The essence of our experimental arrangement is that we employ the cells themselves to attain the desired low O_2 pressures. When we darken the cells the O_2 pressure sinks at once on account of the respiration; and when we illuminate the cells the O_2 pressure rises at once on account of the photosynthesis. This cycle can be repeated as often as desired without opening the vessel. The manometer shows us at any time the prevailing O_2 pressure, and the change in manometer fluid level shows us for any time period of pressure change the respective respiration or photosynthesis. We thus learn whether, and in what manner, respiration or photosynthesis changes as a function of O_2 pressure.

The result is shown graphically in Fig. 6, in which the changes of respiration and photosynthesis are plotted against O_2 pressure. As one sees, both respiration and photosynthesis change with O_2 pressure, and indeed identically. An O_2 pressure of 3 mm of water is the half-saturation value for both processes, and 20 mm yields virtual saturation for both processes. Below an O_2 pressure of 1 mm of water, respiration and photosynthesis are both very small.

The experiment shows much more than that oxygen gas is necessary for photosynthesis. It shows that not merely traces of oxygen are necessary, but definite and easily measurable pressures of oxygen, and that these pressures are necessary because they are necessary for the respiration. All is precisely as our equations demand. *Without respiration, no photosynthesis!*

Chemistry of Photosynthesis

We now leave energetics and turn to the chemistry of photosynthesis. The problems posed here are clearly given by the results of the energetics. What happens chemically to carbonic acid in the dark reaction of photosynthesis? Or, expressed otherwise, what is the photolyte chemically? The gates to this field were opened by the following experiment[7].

The main compartment of a conical manometric vessel (Fig. 7) contains a suspension of *Chlorella*, the side arm contains fluoride, and the gas space contains argon free of CO_2 and O_2. The pH of the suspension and of the fluoride is 3.8. Upon tipping the fluoride from the sidearm into the main compartment, a vigorous evolution of CO_2 from the cells takes place. From 100 mm^3 of *Chlorella* cells, 30 to 40 mm^3 of CO_2 will be developed in a few minutes. The content of this labile CO_2 in Chlorella is thus very great—greater, for example, than the content of oxyhemoglobin-O_2 in red blood cells. A trace of cyanide diminishes the development of the CO_2, from which one must conclude that it is an enzymic reaction that is activated by the fluoride.

There are two facts of special interest about the fluoride reaction. First, if one expels the CO_2 with $N/1000$ fluoride anaerobically, and then passes O_2 into the

suspension, the expelled CO_2 will for the most part be taken up again. The energy of the respiration induced by the added O_2 is necessary for this rebinding of CO_2. Obviously, the analogy here to the dark reaction in photosynthesis is very far-reaching.

Second, and equally important: if one expels the labile CO_2 from the *Chlorella* with low concentrations of fluoride, and then illuminates, photosynthesis is found to be inhibited; but if one removes the fluoride from the cells by washing, and

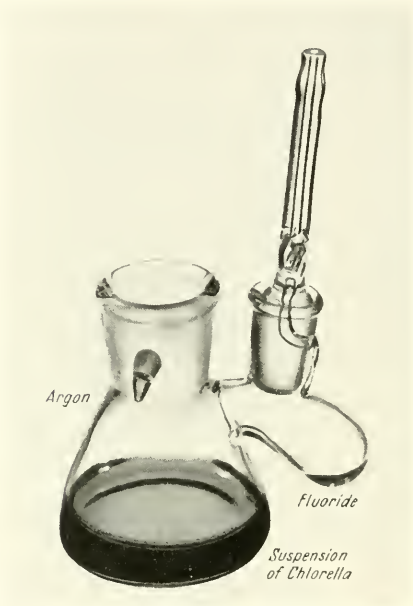


Fig. 7.
Vessel for measuring labile CO_2.

waits until the CO_2 is again aerobically bound, the photosynthetic capacity is found to be restored. Labile CO_2 and photosynthesis are thus mutually dependent.

We have spared no pains to discover what the chemical source of the labile CO_2 is. We have found that it is L-glutamic acid[8], which occurs in *Chlorella* in loosely bound form to the extent of 0.5 to 1 percent of the dry weight. This glutamic acid goes into the external medium when a *Chlorella* suspension is heated at 90°C for several minutes. If one determines the glutamic acid content of the centrifuged external medium *before* and *after* a treatment with fluoride, one finds that as much glutamic acid has disappeared as CO_2 has been developed by the fluoride!

γ-Aminobutyric acid is formed along with the CO_2 in the fluoride reaction. Aerobically, γ-aminobutyric acid and CO_2 react in the cells to yield glutamic acid again, so that aerobically a stationary state is set up between decomposition and resynthesis of glutamic acid:

$$\text{L-Glutamic acid} \rightleftharpoons \gamma\text{-aminobutyric acid} + CO_2$$

The α-decarboxylation of glutamic acid was discovered in bacteria in 1910 by Ackermann and in green plant cells in 1937 by the Japanese Okonuki. Both the

decomposition and resynthesis of glutamic acid can be demonstrated when one transfers the heated extracts of *Chlorella* onto chromatograph filter paper, develops with phenol-citrate solution, and sprays with ninhydrin in the standard way.

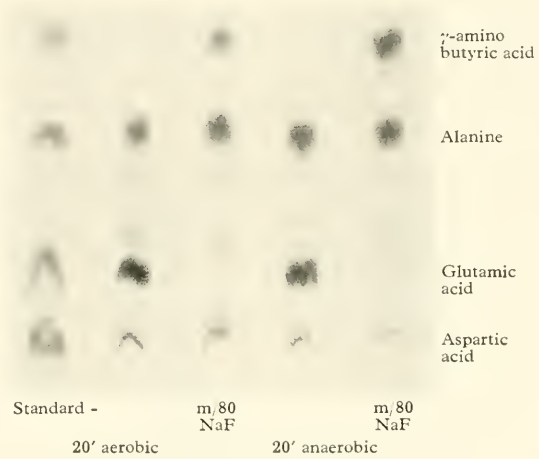


Fig. 8. Action of $N/80$ fluoride: no difference aerobically and anaerobically (phenol-citrate-phosphate; Whatman filter No. 1 unidimensional).

As known test substances for the chromatogram, we have employed aspartic acid, glutamic acid, alanine, and γ-aminobutyric acid. The experimental runs in Fig. 8 show that under its normal living conditions *Chlorella* contains little aspartic acid, much glutamic acid, much alanine, and and no γ-aminobutyric acid. We pre-

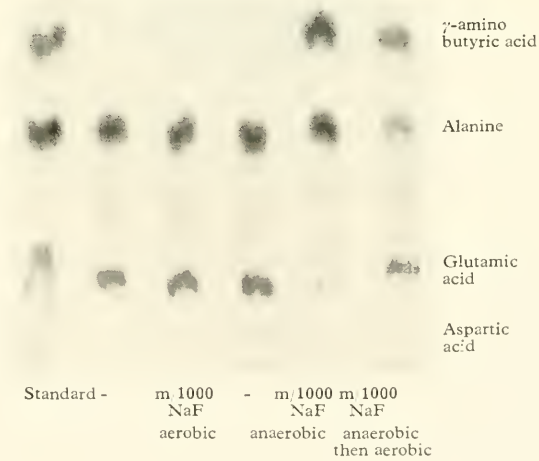


Fig. 9. Action of $N/1000$ fluoride; large difference aerobically and anaerobically (phenol-citrate-phosphate; Whatman filter No. 1 unidimensional).

sume that the glutamic acid is combined with the chlorophyll, since normally cultured cells contain one to two molecules of glutamic acid per molecule of chlorophyll. In $N/80$ fluoride the glutamic acid decreases and appears as γ-aminobutyric acid. This result is obtained both anaerobically and aerobically, since at this high concentration of fluoride no glutamic acid will be resynthesized.

In the experiment of Fig. 9 the fluoride concentration was only $N/1000$, and here one sees a great difference anaerobically and aerobically. Anaerobically the decomposition is very extensive, but aerobically it is small.

The more the glutamic acid is destroyed, just so much the more is the photosynthesis inhibited. For example, two different concentrations of fluoride were added to aliquot *Chlorella* suspensions under aerobic conditions, and the glutamic acid content and photosynthesis measured. Table 2 shows how closely decomposition of glutamic acid and inhibition of photosynthesis parallel each other.

Fig. 10.
Manometric vessel for experiments with radioactive CO_2.

Continuation of these experiments brought forth a further connection between glutamic acid and CO_2. A study of the binding of CO_2 by *Chlorella* at different pressures of CO_2 showed that the labile CO_2 is not only bound as the α-carboxyl of glutamic acid but in addition an equal quantity of CO_2 is dissociably bound under aerobic conditions. This dissociable CO_2 is also given off when the glutamic acid in the cells is decomposed. The saturation value of the dissociating CO_2 is very nearly equal to the glutamic acid content of the cells. The formation of carbaminoglutamic acid is perhaps involved in the dissociable complex.

In conclusion I may mention further that we have begun to study the behavior of amino acids in photosynthesis with the help of radioactive CO_2. The main compartment of a manometric vessel (Fig. 10) is filled with a suspension of *Chlorella*, the Siamese side arm in one part with C^{14}-carbonate and the other part with excess lactic acid. Upon tipping the acid onto the carbonate, a pressure of radioactive CO_2

is obtained in the gas phase. Vessels so prepared were illuminated $^1/_2$, 1, or 5 minutes and then, along with dark control vessels, immersed in hot water in order to stop all enzymatic reactions and at the same time extract the soluble materials from the cells. After centrifugation, the heated extracts were chromatographed in two dimensions, and measurements were made with a Geiger counter.

It can be seen from Table 3, first, that the amino acids, alanine and aspartic acid, rapidly became radioactive—indeed, more rapidly than the phosphorylated glyceric acid, contrary to previous reports in the literature for experiments of this general type. Second, the table shows that aspartic acid and alanine become radioactive more quickly than glutamic acid, so that one can think that an alanine-aspartic acid system enters before the glutamic acid system. Manometric experiments alone have not as yet given any such indication, and one must wait until combined radiometry, manometry, and bolometry have become so far developed quantitatively that one can draw more certain conclusions. Radiometry alone has already led to a multiplicity of errors.

Summary

With the establishment of conditions for optimum culturing and measurement, there is now final proof that in photosynthesis at high as well as low light intensities

Table 2. Comparative action of fluoride on decomposition of glutamic acid and on inhibition of photosynthesis.

Fluoride concentration	Decomposition of glutamic acid (%)	Inhibition of photosynthesis (%)
N/640	21	18
N/320	64	64

the light energy can be almost completely converted into chemical energy. There is thus drawn to a close an investigation that was initiated many years ago in Berlin in the Imperial Institute of Physics[9].

The second result is the establishment of a general physical mechanism of photosynthesis, involving an interplay between light energy and respiratory energy, and therewith the solution of the quantum problem in photosynthesis.

The third result is the establishment of the function of chlorophyll as a stoichiometric, chemically reacting component in photosynthesis.

There remains the special chemistry of photosynthesis. In this still-unfinished field of investigation, the latest discovery is the labile carbon dioxide of *Chlorella*, connected with the decomposition and resynthesis of glutamic acid in living *Chlorella*, and connected with the possible function of the amino acids, aspartic and glutamic, in the binding and reduction of carbonic acid. The dissociating CO_2 is bound by *Chlorella* only in the presence of O_2 and of cellular glutamic acid. This CO_2 is released if the oxygen pressure is lowered below 2 mm of water or if—in the presence of oxygen—the glutamic acid is split in the living *Chlorella*, for example,

Table 3. Geiger counter impulses per minute by chromatographed heated extracts of 10 mm^3 of *Chlorella* cells.

Amino acid or other material	Geiger counter impulses per minute					
	10 min dark, 0.5 min dark	10 min dark, 0.5 min light	5 min dark, 1 min dark	5 min dark, 1 min light	5 min dark, 5 min dark	5 min dark, 5 min light
Aspartic acid	8 520	18 750	9 320	14 205	8 000	30 100
Glutamic acid	1 136	1 614	1 096	1 900	3 350	17 000
Alanine	710	6 950	940	19 000	817	37 500
Phosphorylated sugar and glyceric acid	95	3451	147	9 800	523	23 800
Nonphosphorylated sugar	Not determined		143	113	857	2 726

by $N/10{,}000$ benzoquinone. This is the CO_2 that is used in light and taken up in the dark[8].

Remarks

1) *Quantum requirement in the United States.* In the years 1938 to 1948 the quantum requirement of photosynthesis was measured in various institutes in the United States with the result that 12 to 20 quanta were found to be required by *Chlorella* for the development of one molecule of O_2. The average value was 16. The value of 12 was regarded as the optimum value. A few, including DEAN BURK and VAN NIEL, dissented, but the interpreters and advocates of the high quantum numbers, JAMES FRANCK and EUGENE RABINOWITCH, maintained the upper hand. In 1941 FRANCK and GAFFRON[10] wrote, "*We know now that the high efficiency is only apparent and that the true efficiency is probably only a third of it, namely 12 quanta per molecule CO_2 reduced*" (italics added). The "photosynthesic unit" in Urbana, EMERSON and RABINOWITCH, stayed with the high quantum numbers until at least 1952[11]. Later, under the influence of the Dahlem investigations, the quantum numbers reported in the United States sank, and today approach the Dahlem number of 4 to 3[12].

2) *Light reaction and dark reaction.* According to the equations of the light and dark reactions, which can be separated in point of time, CO_2 is taken up anew in the light reaction, so that the ratio CO_2/O_2 is about —1 in the light reaction per se (although the CO_2 from which the oxygen is developed may not be the CO_2 that is taken up). However, this holds only for optimally cultured cells whose quantum requirement in the balance is 3 to 4. Other cells, for example those grown at a south window with added constant artificial illumination, may take up CO_2 more slowly, so that the ratio CO_2/O_2 in the light reaction is not —1 but lies between —1 and 0. In the latter extreme the new CO_2 is first taken up in the dark reaction following cessation of illumination. Thus there are two reactions of CO_2 to be distinguished: the binding of CO_2, and the transformation of bound CO_2 into the photolyte. In the case of optimally cultured cells, these two reactions of CO_2 may be completely separated, whereas the O_2 development and the binding of CO_2 take place simultaneously and equally. In the less active cells the two reactions of

CO_2 are not separated in time, whereas O_2 development and CO_2-binding are separated. The unraveling of these relations has cost many experiments.

3) *The unit of 2500 chlorophyll molecules.* In 1932 EMERSON and ARNOLD[13] attempted to apply our methods of intermittent illumination[14] to photosynthesis. For example, with very short, very bright light flashes and relatively long dark periods, they determined the maximum quantity of O_2 that appeared to be developed in *one* light flash. Comparison of this quantity of O_2 with the chlorophyll content of the cells showed that 2500 molecules of chlorophyll could develop *one* molecule of O_2. In contrast, we find, without intermittent light, and with direct measurement of the light reaction during inhibition of the dark reaction, that *one* molecule of chlorophyll can develop *one* molecule of O_2. There is thus a discrepany of three powers of 10, depending upon whether the ratio chlorophyll/oxygen is measured with intermittent light or directly. As DEAN BURK[15], [16] has shown, however, the intensity of the light flash in the experiments of Emerson and Arnold was several orders of magnitude too low—that is, entirely insufficient—to decompose all the photolyte in the very short time of the light flash ($\sim 10^{-5}$ second).

4) *Burst of carbon dioxide.* According to EMERSON and LEWIS[17], photosynthesis begins with a burst of CO_2 evolution. This phenomenon was discovered manometrically with the twovessel method, without, however, maintaining the essential requirement of the method. Instead of both vessels being illuminated simultaneously, an interval of 8 to 24 hours took place between illumination of one vessel and the other. This procedure removed the essential condition of the two-vessel method, namely, that in the two unequal vessels the same chemical change must occur. If one properly measures, as nowadays prescribed, the O_2 development in both vessels simultaneously with a divided light beam, one never finds at the beginning of the illumination a burst of CO_2 out of the living cells, but always and only a burst of O_2 corresponding to true photosynthesis.

5) *The experiments of Ruben and Kamen.* When *Chlorella* were illuminated in a bicarbonate solution in which the oxygen of the water, but not that of the carbon dioxide, was isotopically marked, the O_2 developed was marked. Ruben and Kamen[18] concluded that the light decomposed primarily the H_2O but not the CO_2. Obviously this conclusion would have been correct only if one could have brought forth the improbable argument that in light not the hydrate but only the anhydride of carbon dioxide reacted.

6) "*Hill*" *reactions.* If one suspends *Chlorella* cells in nitrate-nitric acid mixture, the cells develop O_2 for many hours when illuminated in the absence of CO_2, according to the equation

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2O_2,$$

a reaction that was discovered in 1920[19]. The mechanism of this reaction has been clarified as follows: the nitric acid oxidizes in a dark reaction the carbon of cell organic matter to carbon dioxide, and then, in light, splitting of the carbon dioxide into C and O_2 occurs, as in ordinary photosynthesis:

$$\begin{array}{ll} \text{(Dark)} & HNO_3 + 2C + H_2O = NH_3 + 2CO_2 \\ \text{(Light)} & 2CO_2 = 2C + 2O_2 \\ \text{(Balance)} & HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2O_2. \end{array}$$

In 1955 we found[20] that one can replace the nitric acid by ferricyanide:

$$\begin{array}{ll} \text{(Dark)} & 4Fe^{3+} + C + 2H_2O = 4Fe^{2+} + 4H^+ + CO_2 \\ \text{(Light)} & CO_2 = C + O_2 \\ \text{(Balance)} & 4Fe^{3+} + 2H_2O = 4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2. \end{array}$$

Both reactions, with living *Chlorella*, appear in the balance as though water were decomposed by light, and as though the oxidizing agent acted only as a hydrogen acceptor, whereas in reality the light reaction is ordinary photosynthesis.

If, in the experiments with living *Chlorella*, one substitutes quinone for the nitric acid or the ferricyanide, CO_2 cannot participate in the development of O_2, since quinone completely inhibits the splitting of CO_2. Likewise, with green grana, CO_2 cannot participate in the development of O_2 since illuminated green grana are unable to reduce CO_2.

One must therefore either postulate two different mechanisms of photochemical O_2 development in green grana and in intact cells, which is improbable, or one must attempt to find a common explanation for the two phenomena: for water decomposition with intermediate photosynthesis, and for water decomposition without intermediate photosynthesis[6].

7) *The experiments of F. W. Allen.* In order to test whether photosynthesis without O_2 is possible, ALLEN[21], at the suggestion of JAMES FRANCK, made use of the fact that the phosphorescence of many dyes is diminished by traces of O_2. A stream of nitrogen containing CO_2 was conducted over glowing copper, from there over water, then over a suspension of *Chlorella*, over liquid nitrogen, and finally over the dye acriflavin adsorbed on silica gel. ALLEN still found detectable photosynthesis at an O_2 pressure of 10^{-6} mm-Hg; whereas our manometry in closed vessels showed, without possiblility of error, that below 10^{-1} mm-Hg photosynthesis in *Chlorella* is very small. What is the meaning of this discrepancy of five powers of 10?

The method of JAMES FRANCK must be calibrated empirically—that is, each O_2 pressure yielding a given phosphorescence must be analytically determined. Furthermore, O_2 pressures of the order of magnitude of 10^{-6} mm-Hg must be produced, maintained, and analytically measured in a rapidly flowing gas. Anyone who is accustomed to performing experiments himself knows that this is an almost insoluble task. In any event, the analytical determination of traces of O_2 is the key aspect to the Franck method, and since ALLEN himself remained silent about this point, one must seek the mistake here. The calibration was obviously false by five powers of 10.

On the other hand, experiments of HILL and WHITTINGHAM[22] agree very well with our results. These workers added reduced hemoglobin to a suspension of *Chlorella* and determined the O_2-development upon illumination by optical measurements of the resulting oxyhemoglobin. They found that photosynthesis already began to fall off at an O_2 pressure of about 2 mm-Hg.

8) *The experiments of Allan Brown on „light-respiration."* When the light reaction and the dark reaction oberlap in photosynthesis under normal conditions, two-thirds of the O_2 developing in the light will be reabsorbed so rapidly that one can think of the oxygen as oscillating between the free state and a binding with carbon. If the molecular O_2 provided the *Chlorella* is isotopically marked, whereas the CO_2

provided is not marked, one cannot expect that more marked O_2 will be consumed in light than in darkness, since in light, on spatial grounds, the unmarked O_2 photosynthetically produced within the cells will be consumed more rapidly than the externally available marked O_2 that must diffuse into the cells. BROWN[23] found, in fact, that in light there was no increase in marked respiration, but often even a decrease of marked respiration; that is, not only the light respiration but also the dark respiration favored the unmarked oxygen produced within the cells photosynthetically from unmarked photolyte. This is a beautiful example of "isotopic discrimination."

The light respiration during illumination has also been the object of attempted measurement elsewhere, for example by WEIGL, WARRINGTON and CALVIN[24], who illuminated green cells in marked CO_2 and expected that in light unmarked CO_2 would be given off in increasing quantity. They found, however, no increase in unmarked CO_2, quite in agreement with our equations, from which it follows that the light respiration must be marked when the CO_2 is marked.

In fact, the light respiration can only be measured as it was first discovered[4]: when it is separated in time from O_2 development[25], [26].

References and Notes

1 WARBURG, O., SCHRÖDER, W., GATTUNG, H., Z. Naturforsch. 11b (1956), 654.
2 WARBURG, O., KRIPPAHL, G., SCHRÖDER, W., Z. Naturforsch. 10b (1955), 631.
3 WARBURG, O., and SCHRÖDER, W., Z. Naturforsch. 12b (1957), 716.
4 BURK, D., and WARBURG, O., Naturwissenschaften 37 (1950), 560; Z. Naturforsch. 6b (1951), 12.
5 WARBURG, O., et al., Z. Naturforsch. 9b (1954), 769.
6 WARBURG, O., and KRIPPAHL, G., Svensk Kem. Tidskr. 69 (1957), 143.
7 WARBURG, O., and KRIPPAHL, G., Z. Naturforsch. 11b (1956), 718; 13b (1958), 63.
8 WARBURG, O., KLOTZSCH, H., KRIPPAHL, G., Naturwissenschaften 44 (1957), 235; Z. Naturforsch. 12b (1957), 266; 12b (1957), 481; 12b (1957), 622.
9 Here bolometry, introduced by the American physicist S. P. LANGLEY, was developed and adapted to photochemistry by LUMMER and KURLBAUM. It was LUMMER's bolometer that played a decisive role in the discovery of light quanta. It was the bolometer of LUMMER and KURLBAUM that was used to measure light energy in the experiments of EMIL WARBURG that laid the foundation of quantitative photochemistry. It is the same bolometer that has now solved the problem of the energetics of photosynthesis [F. KURLBAUM, Wiedemann's Ann. Physik 65 (1898), 746; O. LUMMER and E. PRINGSHEIM, Verhandl. deut. physikal. Ges. 1 (1899), 23; 2 (1900), 163; M. PLANCK, ibid. 2 (1900), 237; E. WARBURG et al., Ann. Physik 40 (1913), 609; E. WARBURG and C. MÜLLER, ibid. 18 (1916), 245; E. WARBURG, Z. Elektrochem. 27 (1921), 135].
10 FRANCK, J., and GAFFRON, H., Advances in Enzymol. 1 (1941), 200.
11 EHRMANTRAUT, H., and RABINOWITCH, E., Arch. Biochem. 38 (1952), 67.
12 WARBURG, O., Biochim. et Biophys. Acta 18 (1955), 163.
13 EMERSON, R., and ARNOLD, W., J. Gen. Physiol. 16 (1932), 191.
14 WARBURG, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230; O. WARBURG and NEGELEIN, E., Biochem. Z. 202 (1928), 202; 214 (1929), 64.
15 BURK, D., CORNFIELD, J., SCHWARTZ, M., Sci. Monthly 73 (1951), 213.
16 BURK, D., Federation Proc. 12 (1953), 611.
17 EMERSON, R., and LEWIS, C., Am. J. Botany 26 (1939), 808; 28 (1941), 789.
18 RUBEN, S., and KAMEN, M., J. Am. Chem. Soc. 62 (1940), 3451.
19 WARBURG, O., and NEGELEIN, E., Biochem. Z. 110 (1920), 66.
20 WARBURG, O., and KRIPPAHL, G., Z. Naturforsch. 10b (1955), 301.
21 ALLEN, F., Arch. Biochem. 55 (1955), 38.
22 HILL, R., and WHITTINGHAM, C., New Phytologist 52 (1953), 133.
23 BROWN, A., Am. J. Botany 40 (1953), 719.
24 WEIGL, J., WARRINGTON, P., CALVIN, M., J. Am. Chem. Soc. 73 (1951), 5058.
25 Reprints of this article may be obtained from the translators. A general review monograph, "Problems in Photosynthesis", by W. BLADERGROEN, will appear later in the year (Thomas, Springfield, Ill.).
26 Note added in proof. Further studies clarifying the mechanism of Hill reactions are in press: O. WARBURG and G. KRIPPAHL, "Hillreactionen" and "Weiterentwicklung der manometrischen Methoden"; O. WARBURG et al., "Oxygenase in Chlorella", Z. Naturforsch.

45 Glutaminsäure in *Chlorella**

Von Otto Warburg, Helmut Klotzsch und Günther Krippahl

Versuche über Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure in lebender *Chlorella* und über den Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Photosynthese.

Wie bereits kurz mitgeteilt[1], stammt die Kohlensäure, die Fluorid aus lebender *Chlorella* entwickelt[2], aus der α-Decarboxylierung der Glutaminsäure:

Glutaminsäure = γ-Aminobuttersäure + CO_2

eine Reaktion, die Ackermann[3] 1910 in Bakterien entdeckte und die seitdem weitverbreitet in Tier- und Pflanzenreich gefunden worden ist[4–7].

Auch gefroren-getrocknete *Chlorella* ist als Ferment dieser Reaktion wirksam, jedoch wesentlich schwächer als lebende *Chlorella*. Bei 20° ist die Halbwertzeit für 100 mm³ lebende *Chlorella* 5 Minuten, für die daraus gewonnene Trockensubstanz 50 Minuten.

Daß die erhebliche und schnelle Kohlensäure-Entwicklung, die bei Zusatz von Fluorid zu lebender *Chlorella* gefunden wird, von einer Decarboxylierung der Glutaminsäure herrührt, ist durch Manometrie gefunden und durch Papierchromatographie bestätigt worden. Immer, wenn Fluorid Kohlensäure aus *Chlorella* entwickelt, nimmt die Glutaminsäure ab und die γ-Aminobuttersäure nimmt zu; und immer, wenn die Fluoridwirkung gehemmt wird, z. B. durch Blausäure oder durch Sauerstoff, wird auch die Zersetzung der Glutaminsäure gehemmt.

Chlorella enthält je nach der Züchtung 0,5 bis 1,3% ihrer Trockensubstanz an Glutaminsäure, und zwar um so mehr Glutaminsäure, als sie Chlorophyll enthält. Beträgt der Chlorophyllgehalt 5 bis 8%, so kommt 1 Mol. bis 2 Mole. Glutaminsäure auf 1 Mol. Chlorophyll. Wahrscheinlich ist in diesen Zellen alle Glutaminsäure an Chlorophyll gebunden. Sehr chlorophyllarme Zellen enthalten mehr Glutaminsäure als Chlorophyll. Wahrscheinlich ist in diesen Zellen ein Teil der Glutaminsäure frei, ein Teil an Chlorophyll gebunden.

Es ist eine sehr wichtige Tatsache, daß Sauerstoff die Zersetzung der Glutaminsäure durch Fluorid hemmt. Die Erklärung ist, daß bei Zusatz von Fluorid die Atmung steigt und daß durch die Energie der gesteigerten Atmung die zersetzte Glutaminsäure wieder so weit aufgebaut wird, bis Zersetzung durch Fluorid und Wiederaufbau durch die Atmung sich die Waage halten. Zum Beispiel zersetzt $n/1000$-Fluorid anaerob die Glutaminsäure vollständig, aerob aber, wegen des Wiederaufbaus, nur zu einem kleinen Teil.

Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure in lebender *Chlorella*, die durch Fluoridzusatz manifest werden, sind Reaktionen, die einen Umsatz von der Größenordnung des Energie-Stoffwechsels haben. Die Idee, daß sie im Mechanismus der Photosynthese eine Rolle spielen, wird nahegelegt durch die Analogie der durch Licht und durch Fluorid induzierten Atmung, deren Energie in beiden Fällen zu Reaktionen benutzt wird, an denen die Kohlensäure beteiligt ist.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, Band 12b, (1957): 622.

Man kann diese Idee prüfen, indem man die Glutaminsäure zersetzt und dann die Lichtwirkung mißt. Es zeigt sich dann, daß die Lichtwirkung in dem Maß sinkt, als die Glutaminsäure zersetzt wird; und daß die Lichtwirkung in dem Maße wieder steigt, in dem die Glutaminsäure wieder aufgebaut wird.

Die Beteiligung der Glutaminsäure an der Wirkung des Lichts scheint uns durch derartige Versuche bewiesen zu sein, doch ist auf Grund von Versuchen[8] mit radioaktiver Kohlensäure daran zu denken, daß ein System Asparaginsäure — Alanin der Glutaminsäure vorgeschaltet ist, da bei Belichtung die Radioaktivität früher in Asparaginsäure als in Glutaminsäure erscheint.

Asparagin kommt in sehr kleinen Mengen, Alanin in größeren Mengen in *Chlorella* vor. Eine Asparaginsäure-Decarboxylase haben wir bisher in *Chlorella* nicht nachweisen können.

Die beiden letzten Abschnitte dieser Arbeit betreffen die dissoziierende Kohlensäure der *Chlorella*, insbesondere diejenige dissoziierende Kohlensäure, die nur bei Gegenwart von Sauerstoff gefunden wird und die Beziehungen zur Glutaminsäure zu haben scheint. Während wir bei Belichtung keine Abnahme der Glutaminsäure in *Chlorella* gefunden haben, zeigte es sich, daß die dissoziierende Kohlensäure, wenn im Licht Sauerstoff entwickelt wird, erheblich abnimmt und in stark belichteten Zellen völlig verschwindet. Verdunkelt man dann wieder, so steigt die aerobe dissoziierende Kohlensäure im Verlauf von 20 Minuten — das ist gerade die Zeit, in der die lichtinduzierte Atmung abklingt[9] — wieder auf ihren Dunkelwert.

1. Die Versuchszellen und Versuchsmedien

Chlorella wurde in dem früher angegebenen Salzmedium[10], unter Zusatz der Mikroelemente, in 250-cm³-Kolben, unter Durchleitung von 5 Vol.-Proz. CO_2 30 Vol.-Proz. O_2 65 Vol.-Proz. Argon, bei 25° gezüchtet. Belichtet wurde mit Tageslicht + Metallfadenlicht, oder nur mit Metallfadenlicht, kontinuierlich oder fluktuierend[11]. Der Chlorophyllgehalt der Zellen hängt von der Lichtintensität bei der Zucht ab und wurde von 1% bis 8% der Trockensubstanz variiert. Wir bezeichnen in dieser Arbeit die verschiedenen Kulturen folgendermaßen:

Südzellen. Sie wurden an einem Südfenster unter Zusatz von 300 W Metallfadenlicht am Tage und 200 W Metallfadenlicht nachts gezüchtet. Sie vermehrten sich in 24 Stdn. von 60 auf 350 mm³ und in 48 Stdn. auf 650 mm³. Die 2tägigen Südzellen enthalten 7 bis 8% ihres Trockengewichtes an Chlorophyll. Auf 1 Mol. Chlorophyll kommt in diesen Zellen fast genau 1 Mol. Glutaminsäure.

Nordzellen. Sie wurden ohne Zusatz von Tageslicht, in einem gegen außen verdunkelten Raum, mit 2 · 200 W Metallfadenlicht gezüchtet und vermehrten sich in 48 Stdn. von 60 auf 1500 mm³. Sie enthalten 5 bis 6% ihres Trockengewichts an Chlorophyll. Auf 1 Mol. Chlorophyll kommt in diesen Zellen 1 Mol. bis 2 Mol. Glutaminsäure.

A-Zellen. Sie wurden ohne Tageslicht mit fluktuierendem Metallfadenlicht (300-W-Lampe, Spannung 3 Stdn. ansteigend von 50 auf 220 V, 9 Stdn. 220 V, 3 Stdn. absteigend, 9 Stdn. 50 V) gezüchtet und vermehrten sich in 24 Stdn. von 60 auf 160 mm³, in 48 Stdn. auf 350 mm³. Die 1tägigen A-Zellen haben 4% ihres Trockengewichts an Chlorophyll, die 2tägigen haben 6% Chlorophyll. In diesen Zellen kommen etwa 1,5 Mole Glutaminsäure auf 1 Mol Chlorophyll.

x-Zellen. Sie entstehen, wenn die Kulturen sehr stark, ohne Tageslicht, mit 4 · 200-W-Metallfadenlampen belichtet werden, die von zwei Seiten nahe an die Kulturkolben herangebracht werden. Sie vermehren sich in 24 Stdn. von 60 auf 200 mm³. Sie enthalten etwa 1,2% Chlorophyll und 3- bis 5mal soviel Mole Glutaminsäure als Chlorophyll.

Die x-Zellen verhalten sich auch sonst atypisch. Bringt man sie unter anaerobe Bedingungen, so bilden sie viel mehr und viel schneller Milchsäure als die andern Zellen. Die Folge davon ist, daß wegen der Säuerung anaerob bald eine Decarboxylierung der Glutaminsäure einsetzt, deren Kohlen-

säure von früheren Autoren irrtümlicherweise auf alkoholische Gärung zurückgeführt worden ist. Tatsächlich ist die Gärung der *Chlorella* eine reine Milchsäuregärung. Merkwürdigerweise aber ist diese Milchsäure nicht L-, sondern D-Milchsäure, wie in einer Arbeit mit GEWITZ und VOELKER gezeigt werden wird. Was die Wirkung des Lichts in diesen Zellen anbetrifft, so ist sie mindestens 10mal geringer als in den andern Zellen, offenbar als Folge einer Gegenreaktion der Zellen gegen die Überbelichtung bei der Zucht. — Die x-Zellen sind als Versuchsmaterial nützlich, wenn man die Glutaminsäure in *Chlorella* ohne Zusatz von Fluorid zersetzen will. Wegen der Milchsäurebildung wird in diesen Zellen anaerob, ohne Fluorid, Glutaminsäure zersetzt, aerob wird die Glutaminsäure wieder aufgebaut.

Versuchsmedien. Für die Versuche wurden die Zellen aus der Kulturlösung in einfachere Medien übertragen, in die Salzlösungen S oder S*.

Salzlösung S. 10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 5 g KH_2PO_4 + 4 g NaCl + 0,4 g NH_4Cl + 2 *l* Wasser + 0,6 cm^3 *n*-H_2SO_4 . pH 3,8.

*Salzlösung S**. 10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 5 g KH_2PO_4 + 2 *l* Wasser + 0,6 cm^3 *n*-H_2SO_4 · pH 3,8.

Salzlösungen 1/10 S oder 1/10 S*. Dies waren die Salzlösungen S oder S*, mit Wasser auf das 10-fache verdünnt. 1/10 S* wurde vielfach für papierchromatographische Versuche verwendet, bei denen ein höherer Salzgehalt stört. Dest. Wasser schädigt *Chlorella* und darf als Suspensionsmittel bei biologischen Reaktionen nicht verwendet werden. Wurden die stärkeren Salzlösungen S und S* bei papierchromatographischen Versuchen verwendet, so wurde nach Ablauf der biologischen Reaktion zentrifugiert, die Salzlösung durch Wasser ersetzt, und 10 Min. auf 90° erhitzt und die überstehende Lösung eingetrocknet.

2. Glutaminsäure, manometrisch mit Zell-Trockenpulver

Chlorella, suspendiert in dest. Wasser, wurde in gefrorenem Zustand getrocknet. In dem Trockenpulver sind die Formen der Zellen erhalten, jedoch sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig und nicht mehr imstande, im Licht Kohlensäure zu reduzieren. Das Trockenpulver, suspendiert in Wasser oder Salzlösungen, decarboxyliert L-Glutaminsäure, nach unsern bisherigen Erfahrungen keine andern Aminosäuren, insbesondere nicht Asparaginsäure; und auch nicht Brenztraubensäure. Es eignet sich deshalb zur Bestimmung von L-Glutaminsäure in Zellextrakten. Indem wir aus Zellextrakten mit Trockenpulver Kohlensäure entwickelten und mit Hilfe dieser Tests die Substanz isolierten, aus denen die Kohlensäure stammte, fanden wir, daß die Quelle der Kohlensäure Glutaminsäure ist. — Die Suspension des Trockenpulvers in Wasser wird durch 10^{-3}-*n*. Blausäure inaktiviert, durch Erwärmen auf 70° schnell unwirksam.

Zur Bestimmung der Glutaminsäure brachten wir 20 mg Trockenpulver in die Birne eines kegelförmigen Manometriegefäßes. Der Hauptraum enthielt 3 cm^3 der zu bestimmenden Lösung. pH nach Zugabe des Trockenpulvers war 5,0, die Temperatur war 20°, der Gasraum enthielt Argon. Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, bei dem die zugesetzten 4,8 μMole Glutaminsäure nach 50 Minuten zur Hälfte zersetzt worden waren.

Einer Erläuterung bedarf, warum ohne Zusatz von Glutaminsäure Kohlensäure entwickelt wird. Diese Kohlensäure stammt aus der Glutaminsäure des Trockenpulvers. Die Glutaminsäure ist in dem Trockenpulver fest gebunden und kann durch Wasser, sogar bei 100°, nur schwer extrahiert werden. Die so bestimmte Glutaminsäure betrug in 20 mg Trockenpulver 1 bis 1,5 μMole.

Beim Erhitzen frischer Zellen jedoch, die in Wasser oder Salzlösung suspendiert sind, wird die Glutaminsäure extrahiert und kann in solchen Extrakten mit *Chlorella*-Trockenpulver bestimmt werden. Gibt man vor dem Erhitzen Fluorid zu den

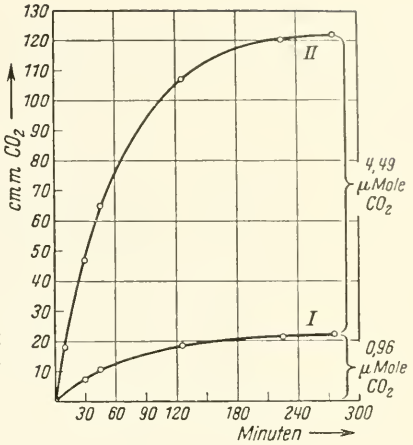


Abb. 1. Decarboxylierung der L-Glutaminsäure durch 20 mg *Chlorella*-Trockenpulver. 20°. Anaerob. pH 3,8. I: 3 cm³ Salzlösung S. II: 3 cm³ Salzlösung S + 4,8 µMole L-Glutaminsäure.

Zellen, wäscht dann das Fluorid wieder fort und erhitzt dann die Zellen, so kann man zeigen, daß die Glutaminsäure durch das Fluorid zersetzt worden ist.

Zum Beispiel wurden 500 mm³ *Chlorella* in 3 cm³ Salzlösung S* suspendiert und 10 Minuten auf 90° erhitzt. Dann wurde zentrifugiert und im überstehenden Hitzeextrakt die Glutaminsäure mit 20 mg Trockenpulver, wie im Versuch der Abb. 1, bestimmt. Wir fanden bei 20° in 275 Minuten die folgenden Endwerte an Kohlensäure:

aus reiner Salzlösung	aus Hitzeextrakt	aus Hitzeextrakt, der mit $n/80$-F 15 Min. vorbehandelt war
+ 28 mm³ CO_2	+ 210 mm³ CO_2	+ 75 mm³ CO_2
	— 28 mm³ CO_2	— 28 mm³ CO_2
	+ 182 mm³ CO_2	+ 47 mm³ CO_2

Aus den 500 mm³ *Chlorella* waren also 7,3 µMole Glutaminsäure beim Erhitzen extrahiert worden, das ist

$$\frac{7{,}3 \cdot 0{,}147}{500 \cdot 0{,}225}\,100 = 0{,}94\,\%\ \text{des Zell-Trockengewichts.}$$

74% davon waren durch das Fluorid zersetzt worden.

3. Glutaminsäure, chromatographisch

Um die Glutaminsäure, ihren Zerfall und Wiederaufbau, chromatographisch zu bestimmen, wurde zu 100 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S, anaerob oder aerob, Fluorid verschiedener Konzentration gegeben. pH war immer 3,8. War die Glutaminsäure anaerob zersetzt oder hatte sich aerob der stationäre Zustand zwischen Zerfall und Wiederaufbau eingestellt, so wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 3 cm³ Wasser aufgewirbelt und 5 Minuten auf 90° erwärmt. Dann wurde wieder zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit im Vakuum eingetrocknet, ein Teil, der 5 mm³ Zellen entsprach, auf Papier aufgetragen, mit Phenol-Citrat-Phosphat entwickelt und mit Ninhydrin besprüht. Die Abb. 2, 3

und 4 zeigen einige Ergebnisse. In der Standardspalte sieht man in aufsteigender Folge Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin und γ-Aminobuttersäure.

Man beachte, daß man in keiner Abbildung eine deutliche Änderung der Konzentrationen der Asparaginsäure oder des Alanins sieht.

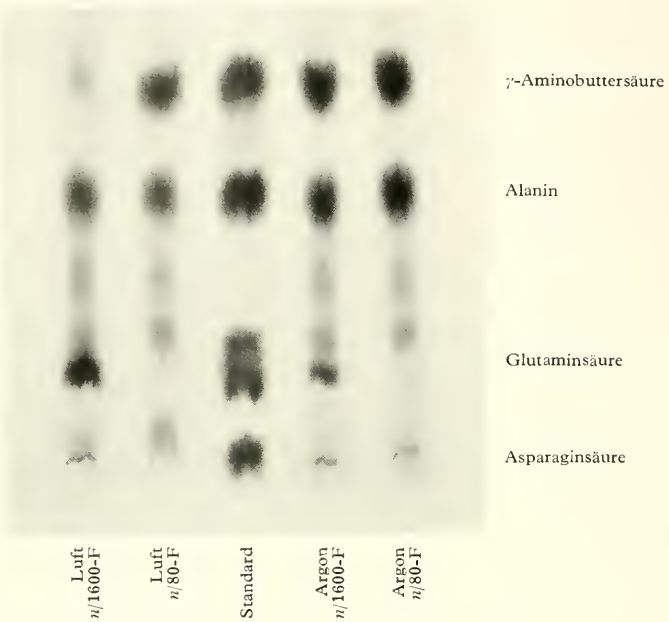


Abb. 2. Spaltung der Glutaminsäure in γ-Aminobuttersäure + CO_2 anaerob durch $n/1600$- und $n/80$-Fluorid. Aerob durch $n/80$-Fluorid, aber nicht durch $n/1600$-Fluorid.

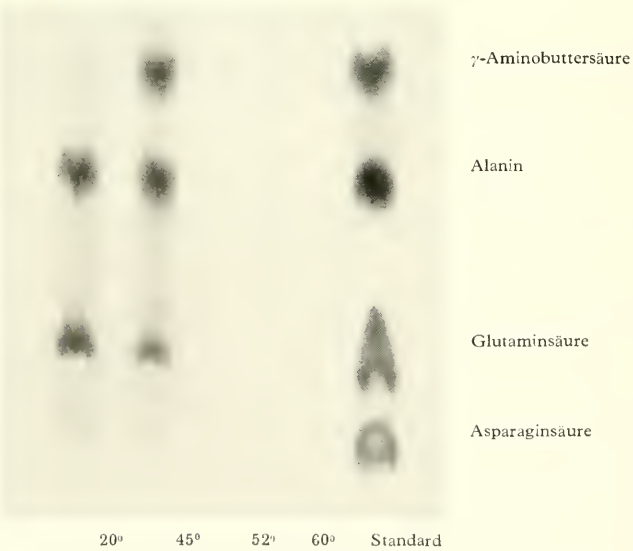


Abb. 3. Spaltung der Glutaminsäure in γ-Aminobuttersäure + CO_2 durch Erwärmen auf 45^0. Bei 52^0 und 60^0 ist nichts zu sehen, weil die Aminosäuren bereits durch die Salzlösung extrahiert worden sind.

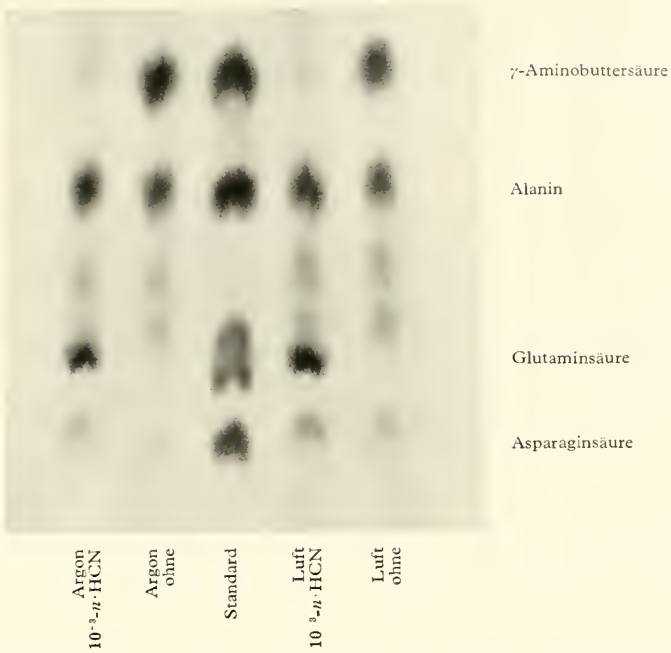


Abb. 4. $n/80$-Fluorid in Argon oder Luft ± Blausäure. Die große Fluoridkonzentration $n/80$ zersetzt in Argon wie in Luft alle Glutaminsäure. 10^{-3} n-Blausäure verhindert die Zersetzung anaerob wie aerob.

4. Glutaminsäure, manometrisch

Auf Grund der beschriebenen Versuche ist es unzweifelhaft, daß die labile Kohlensäure[2] der *Chlorella*, die sich bei Zusatz von Fluorid oder durch andere Maßnahmen entwickelt, aus der α-Decarboxylierung der Glutaminsäure stammt, so daß man die Glutaminsäure in *Chlorella* manometrisch bestimmen kann, indem man Fluorid zu *lebender Chlorella* gibt und die Entwicklung der Kohlensäure mißt. Dies ist eine große Vereinfachung gegenüber den Versuchen mit Zellextrakten und Trockenferment und auch gegenüber den chromatographischen Versuchen. Durch Zusatz von Fluorid zu lebenden Zellen haben wir die Möglichkeit, Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure *im Leben* hervorzurufen und dadurch über die Funktion der Glutaminsäure im Leben Auskunft zu erhalten.

Man muß dabei unterscheiden zwischen hohen und niedrigen Fluoridkonzentrationen. $n/80$-Fluorid ist eine hohe Konzentration, es zersetzt die Glutaminsäure irreversibel und zersetzt deshalb anaerob und aerob die Glutaminsäure vollständig. Ordnet man dabei die Manometrie so an, daß v_F klein gegen v_G ist, so stört die Atmung in der kurzen Zeit der Glutaminsäurezersetzung nicht, und man erhält dieselben Drucke an entwickelter Kohlensäure, ob der Gasraum Argon oder Luft enthält.

Kleinere Fluoridkonzentrationen, $n/1000$ bis $n/300$, zersetzen die Glutaminsäure reversibel und steigern außerdem die Atmung. Wenn die Bedingungen aerob sind, wird deshalb der Druck der entwickelten Kohlensäure in nicht übersehbarer Weise

vermindert, so daß aerob die Glutaminsäure aus dem entwickelten Druck nicht bestimmt werden kann. Um trotzdem die aerobe Glutaminsäure-Zersetzung manometrisch zu messen, lassen wir zunächst die kleine Fluorid-Konzentration einwirken und zersetzen dann den Rest der Glutaminsäure durch viel Fluorid. Wenn z. B. $n/80$-Fluorid aus 100 mm³ Zellen, die mit Luft gesättigt sind, direkt 40 mm³ Kohlensäure entwickelt, aber nach Einwirkung von $n/1000$-Fluorid nur 30 mm³, so hat $n/1000$-Fluorid $^1/_4$ der Glutaminsäure zersetzt. Man beachte, daß bei dieser Anordnung alles aerob geschieht und somit alle Einwände, die mit der anaeroben Milchsäurebildung zusammenhängen, fortfallen.

Bei der „aeroben" Methode ist bei Sättigung mit Luft darauf zu achten, daß nach Schließen der Hähne nicht zu lange mit der Zugabe des Fluorids gewartet wird. Andernfalls könnte es sein, daß infolge der Atmung der Kohlensäuredruck so weit steigt, daß sich merkliche Mengen an dissoziierender Kohlensäure in der *Chlorella* bilden (vgl. Abschnitt 6).

5. Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure

Während die Glutaminsäure anaerob durch sehr kleine Konzentrationen an Fluorid vollständig zersetzt wird, findet aerob eine Rückbildung von Glutaminsäure statt:

$$\text{Glutaminsäure} \rightleftarrows \gamma\text{-Aminobuttersäure} + CO_2.$$

Indessen ist die Reaktion von rechts nach links keine einfache Rückreaktion, da die Reaktion anaerob vollständig in der Richtung der Zersetzung verläuft. Zur Rückreaktion, zum Wiederaufbau der Glutaminsäure, ist Sauerstoff, d. h. ist Atmung nötig und tatsächlich steigt die Atmung, wenn man aerob kleine Mengen Fluorid zu *Chlorella* hinzufügt. Zum Beispiel verbrauchten in 5 Minuten 100 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S, bei 20° in Luft die folgenden Mengen an Sauerstoff, wenn sich im Einsatz der Manometriegefäße Kalilauge befand:

		2tägige Südzellen [mm³]	1tägige A-Zellen [mm³]
ohne F	10′	— 10	— 5,2
in $n/640$-F	10′	— 12,5	— 9,4
	10′	— 18,4	— 11,4
	10′	— 17,9	— 12,7

Die gleiche Konzentration an Fluorid, in der gleichen Salzlösung, die diese Steigerung der Atmung bewirkte, entwickelte aus *Chlorella* anaerob oder aerob die folgenden Mengen an Kohlensäure aus Glutaminsäure (Endwerte nach 20 Minuten bei 20°):

		[mm³]
anaerob durch	$n/72$-F	42
	$n/640$-F	42
	$n/72$-F nach $n/640$-F	0
aerob durch	$n/72$-F	42
	$n/640$-F	nicht gemessen
	$n/72$-F nach $n/640$-F	32,9
also aerob durch	$n/640$-F	42 − 31,9 = 9,1

Das Ergebnis ist, daß $n/640$ Fluorid die Glutaminsäure anaerob zu 100 %, aber aerob nur zu 21 % zersetzt. Aus dem so gefundenen stationären Zustand zwischen

Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure und aus der Geschwindigkeit der anaeroben Zersetzung der Glutaminsäure kann man berechnen, daß aerob (in $n/640$-Fluorid) pro Stunde das $2^1/_2$fache Zellvolumen an Kohlensäure gebunden wird.

6. Dissoziierende Kohlensäure

Sättigt man *Chlorella* mit verschiedenen Kohlensäuredrucken und gibt dann Fluorid hinzu, so wird nicht nur Kohlensäure aus der Glutaminsäure entwickelt, sondern auch aus Bicarbonat, das durch Umsetzung mit Salzen schwacher Säuren entstanden ist, vielleicht auch aus Carbaminsäuren, die durch die Siegfriedsche Reaktion in *Chlorella* entstanden sind. Diese Kohlensäure ist abhängig vom Kohlensäuredruck, während die aus Glutaminsäure entwickelte Kohlensäure unabhängig vom Kohlensäuredruck ist.

Bei diesen Versuchen haben wir die bisher chemisch noch nicht erklärte Tatsache gefunden, daß aerob viel mehr Kohlensäure dissoziierend gebunden wird als anaerob. Wurden z. B. 100 mm^3 2tägige Südzellen, die 1,84 μMole Chlorophyll enthielten und in 3 cm^3 Salzlösung (pH 3,8) suspendiert waren, mit Kohlensäuredrucken von $^1/_{20}$ bis $^1/_2$ Atmosphäre gesättigt, so trieb $n/80$-Fluorid bei 20^0 in 20 Minuten die folgenden Mengen an Kohlensäure aus (Endwerte):

CO_2-Druck [Atm]	0	1/20	1/10	1/5	1/2
Anaerob CO_2 [mm^3] (CO_2-Argon)	38,8	44,7	48,2	51,8	56,3
Aerob CO_2 [mm^3] (25 Vol.-Proz. O_2)	38,0	51,5	63,0	79,5	97

Zieht man hier von den anaeroben Werten die aus Glutaminsäure beim CO_2-Druck Null entwickelte Kohlensäure ab, so erhält man die „anaerobe dissoziierende CO_2"; und zieht man von den aeroben Werten die anaeroben Werte ab, so erhält man diejenige CO_2, *die nur unter dem Einfluß des Sauerstoffs gebunden wird* und die wir die nur „aerob dissoziierende CO_2" nennen wollen. Die beiden Subtraktionen ergeben:

CO_2-Druck [Atm]	1/20	1/10	1/5	1/2
Anaerob CO_2 [mm^3]	5,9	9,4	13	17,5
Aerob CO_2 [mm^3]	6,8	14,8	27,7	40,7

Das Ergebnis ist in Abb. 5 graphisch dargestellt. Man sieht, daß anaerob wie aerob der Sättigungswert bei einem CO_2-Druck von einer halben Atmosphäre erreicht wird; er ist für die nur aerob dissoziierende CO_2 $2^1/_2$mal so groß wie für die anaerobe dissoziierende CO_2.

Vergleicht man die Dissoziationskurven der nur aerob dissoziierenden CO_2 für verschieden gezüchtete *Chlorella*, so findet man große Unterschiede. 1tägige A-Zellen — die die besten Quantenausbeuten geben — binden die aerobe CO_2 fester, als 2tägige Südzellen, die eine schlechtere Quantenausbeute geben. Zum Beispiel fanden wir die folgenden Sättigungsgrade der nur aerob dissozierenden CO_2:

CO_2 Druck [Atm]	1/20	1/10	1/5	1/2
% Sättigung in 1täg. A-Zellen	65	72	84	100
% Sättigung in 2täg. Südzellen	17	36	68	100

Eine weitere interessante Eigenschaft der nur aerob dissozierenden Kohlensäure ist, daß der Sättigungswert gleich dem Glutaminsäuregehalt der Zellen ist. In dem Versuch der Abb. 5 betrug der Gehalt an Glutaminsäure 38,4 mm^3, der Sättigungswert der nur aerob dissozierenden CO_2 41 mm^3 CO_2, der Chlorophyllgehalt 41,2 mm^3. Glutaminsäuregehalt, Chlorophyllgehalt und Sättigungswert der nur aerob dissozierenden CO_2 waren also innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

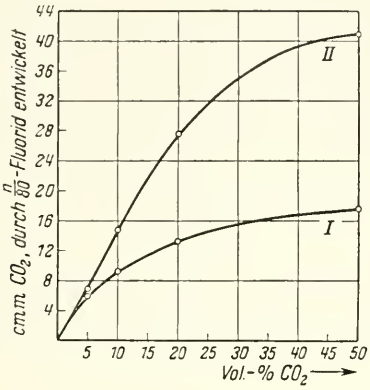


Abb. 5. Disoziierende CO_2, durch $n/80$-Fluorid bei pH 3,8 und 20° aus *Chlorella* entwickelt. I: anaerob dissoziierende CO_2. II: nur aerob dissoziierende CO_2.

Dieselben 3 Größen bestimmten wir für x-Zellen, die 5mal soviel Glutaminsäure als Chlorophyll enthielten. Wir fanden in 100 mm^3 x-Zellen:

	[μMole]
Sättigungswert der nur aerob dissoziierenden CO_2:	1,9
Glutaminsäure:	1,9
Chlorophyll:	0,418

In solchen Zellen also, in denen Chlorophyll- und Glutaminsäuregehalt verschieden sind, ist der Sättigungswert der nur aerob dissozierenden CO_2 gleich dem Glutaminsäure- und nicht gleich Chlorophyllgehalt.

Anmerkung. Als wir den Einfluß des Sauerstoffs auf die dissoziierende CO_2 fanden, dachten wir zunächst, daß der anaerobe Wert der dissoziiertenden CO_2 kleiner gefunden wird, weil anaerob in der Sättigungszeit die gebildete Milchsäure bereits einen Teil der CO_2 austreibt. Durch Versuche mit 2tägigen Südzellen, die anaerob nur sehr langsam Milchsäure bilden und durch Variation der Sättigungszeiten konnte dieser Einwand ausgeschlossen werden.

7. Glutaminsäure und Lichtwirkung

Bereits in unsrer vorigen Mitteilung[2] haben wir beschrieben, wie man durch steigende Konzentrationen von Fluorid die Lichtwirkung in *Chlorella* in zunehmendem Maß hemmen kann. Wir können dieses Ergebnis heute so ausdrücken, daß mit zunehmendem *Zerfall der Glutaminsäure* die Lichtwirkung mehr und mehr gehemmt wird. Den Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Lichtwirkung haben wir jetzt quantitativ untersucht, indem nach der Messung der Lichtwirkung der Rest an Glutaminsäure durch Zusatz von viel Fluorid gemessen wurde. So konnten wir für verschiedene (kleine) Konzentrationen an Fluorid Glutaminsäuregehalt und Lichtwirkung quantitativ vergleichen. Zum Beispiel fanden wir, wenn

aerob mit $n/640$- und $n/320$-Fluorid der stationäre Zustand zwischen Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure hergestellt worden war:

Konzentration des Fluorids	Glutaminsäure-Rest [%]	Rest der Lichtwirkung [%]
$n/640$	79	82
$n/320$	36	36

wobei die Lichtwirkung, in 10 Vol.-Proz. CO_2 30 Vol.-Proz. O_2, mit den Intensitäten $\mathcal{J} = 430$ oder $\mathcal{J} = 57$ mm³ Quanten pro Minute bestimmt wurde.

Den Einwand, das Fluorid hemme die Lichtwirkung nicht wegen der Zersetzung der Glutaminsäure, sondern aus anderen Gründen, kann man ausschließen, indem man die Hemmung der Lichtwirkung durch ein und dieselbe Fluoridkonzentration anaerob und aerob vergleicht, z. B. durch $n/1000$-Fluorid, das anaerob alle Glutaminsäure, aber aerob nur wenig Glutaminsäure zersetzt. Dann findet man — bei der gleichen Fluoridkonzentration — anaerob eine sehr große und aerob eine sehr kleine Hemmung der Lichtwirkung.

Es lag daraufhin nahe zu prüfen, ob die Glutaminsäure beim Belichten von *Chlorella* abnimmt. Wir haben in keinem Fall eine Abnahme gefunden in Versuchen, in denen die Glutaminsäure nach langer Verdunklung oder nach Belichtung sowohl manometrisch mit Fluorid als auch chromatographisch bestimmt wurde.

8. Dissoziierende Kohlensäure und Lichtwirkung

Während die Glutaminsäure im Licht nicht abnimmt, fanden wir, daß die aerobe dissoziierende Kohlensäure im Licht sehr stark abnimmt. Die Versuche wurden mit 1tägigen A-Zellen ausgeführt, von denen 100 mm³ in 3 cm³ Salzlösung S (pH 3,8) suspendiert waren und die mit 20 oder 30 Vol.-Proz. CO_2 25 Vol.-Proz. O_2 gesättigt waren. Zum Beispiel entwickelte $n/80$-Fluorid die folgenden Mengen an Kohlensäure:

aus verdunkelten Zellen	aus Zellen, die 2 Min. mit $\mathcal{J} = 30$ mm³ Quanten/Min. belichtet worden waren
90 mm³ CO_2	73 mm³ CO_2

oder, wenn mit sehr hoher Intensität belichtet wurde

aus verdunkelten Zellen	nach 1 Min. $\mathcal{J} = 800$	nach 5 Min. $\mathcal{J} = 800$
77 mm³ CO_2	62 mm³ CO_2	49 mm³ CO_2

Die dissoziierende Kohlensäure nahm also bei Belichtung sehr erheblich ab. Wurden die im 2. Versuch verwendeten Zellen, nachdem sie 5 Minuten mit der hohen Intensität $\mathcal{J} = 800$ Quanten/Minuten belichtet worden waren, verdunkelt und wurde dann nach verschiedenen Dunkelzeiten das Fluorid zu den Zellen gegeben, so entwickelte $n/80$-Fluorid nach wachsenden Dunkelzeiten die folgenden Mengen an Kohlensäure:

Min.:	0	1	5	10	20	dunkel
CO_2 [mm³]:	49	46	62	72	75	

Der Hellwert an dissoziierender CO_2 stieg also im Lauf von 20 Dunkelminuten wieder auf den ursprünglichen Dunkelwert.

Zusammengefaßt ist das Ergebnis der Versuche: Entwickelt man durch Belichtung vorher verdunkelter Zellen die Sauerstoffkapazität[9] der *Chlorella,* so nimmt während der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung die dissoziierende Kohlensäure sehr stark ab. Im Dunkeln, in der Zeit, in der die induzierte Atmung die Sauerstoffkapazität wieder herstellt, steigt die dissoziierende Kohlensäure wieder auf ihren Anfangswert.

Literatur

1 Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 266.
2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 11b (1956), 718.
3 Ackermann, D., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 69 (1910), 279.
4 Okonuki, K., Botan. Mag. (Tokio) 51 (1937), 270.
5 Taylor, E. S., und Gale, E. F., Bioch. J. 39 (1945), 52.
6 Schales, O., Mims, V., und Schales, S., Arch. Biochemistry 10, 455; 11 (1946), 155.
7 Roberts, E., und Frankel, S., J. biol. Chemistry 190 (1951), 505.
8 Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 481.
9 Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., und Buchholz, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 769; O. Warburg und W. Schröder, Z. Naturforschg. 10b (1955), 639.
10 Vorschrift siehe Z. Naturforschg. 10b (1955), 631.
11 Warburg, O., Schröder, W., und Gattung, H. W., Z. Naturforschg. 11b (1956), 654.

46 Beweis der Notwendigkeit der Glutaminsäure für die Photosynthese*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Durch Messung der Photosynthese nach anaerobem Zerfall und aerobem Wiederaufbau der Glutaminsäure unter sonst identischen Bedingungen wird bewiesen, daß die Glutaminsäure in einem quantitativen Verhältnis zur Photosynthese steht.

Daß die Glutaminsäure, von der *Chlorella* etwa 1% ihres Trockengewichts in loser Bindung enthält, mit der Photosynthese der *Chlorella* zusammenhängt, ist nach früheren Versuchen[1] bereits sehr wahrscheinlich gewesen. Der Beweis ist nunmehr folgendermaßen erbracht worden:

Gibt man zu *Chlorella* soviel Fluorid, daß die Fluorid-Konzentration in der Suspensionsflüssigkeit $n/1000$ ist, so wird die Glutaminsäure unter anaeroben Bedingungen in Kohlensäure und γ-Aminobuttersäure gespalten; leitet man dann Sauerstoff ein, so wird die Glutaminsäure wieder aufgebaut. So kann man, durch Wechsel von anaeroben und aeroben Bedingungen, lebender *Chlorella* ihre Glutaminsäure in kurzen Zeiten fortnehmen und wiedergeben. Verbindet man damit Messungen der Photosynthese, so findet man, daß $n/1000$-Fluorid die Photosynthese anaerob, aber nicht aerob hemmt. Zerfall der Glutaminsäure und Hemmung der Photosynthese, Wiederaufbau der Glutaminsäure und Wiederanstieg der Photosynthese sind also Vorgänge, die gleichzeitig und in gleichem Maß auftreten.

In Abb. 1 ist ein aerober Versuch ohne Fluorid und mit $n/1000$-Fluorid graphisch dargestellt, und man sieht, daß die Photosynthese durch das $n/1000$-Fluorid aerob kaum gehemmt wird. Nach Beendigung des Versuchs wurden mit 10 Vol.-% Kohlensäure, 90 Vol.-% Argon anaerobe Bedingungen in den beiden Gefäßen hergestellt, und es wurde zunächst 1 Stunde anaerob geschüttelt, um die Glutaminsäure in $n/1000$-Fluorid vollständig zu zersetzen. Dann wurde mit der gleichen Intensität wie vorher bei dem aeroben Versuch belichtet (Abb. 2).

Abb. 2 zeigt, wie erheblich die Photosynthese in $n/1000$-Fluorid unter den anaeroben Bedingungen zunächst gehemmt ist. Im Lauf der autokatalytischen Entwicklung des Sauerstoffs im Licht verschwindet jedoch allmählich die Hemmung der Photosynthese, weil die anaeroben Bedingungen allmählich, mit wachsendem Sauerstoffdruck, in aerobe Bedingungen übergehen. Die Atmung der Zellen steigt, durch die Energie der Atmung wird in Kurve II die Glutaminsäure aus ihren Spaltungsprodukten wieder aufgebaut und gleichzeitig steigt die Photosynthese.

Die quantitativen Verhältnisse sind bei dem anaeroben Versuch bemerkenswert. Wurde die Glutaminsäure am Anfang und Ende des Versuchs bestimmt, so wurde in der fluoridfreien Kontrolle anfangs und am Ende die gleiche Menge Glutaminsäure gefunden, nämlich 1,7 μMole in den eingesetzten 100 mm^3 Zellen. In $n/1000$-Fluorid jedoch wurden anfangs 0 μMole und am Ende 1,47 μMole Glu-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 63.

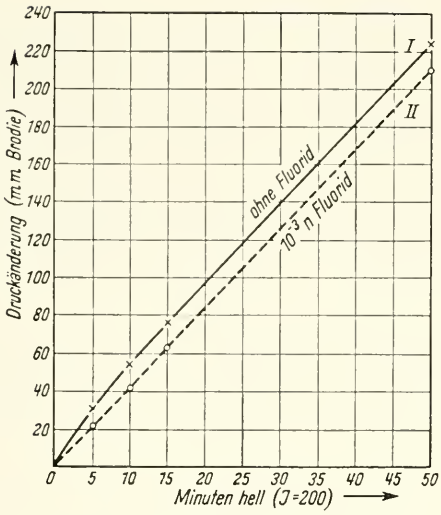


Abb. 1. Aerober Versuch. In jedem Gefäß 100 mm³ Zellen, suspendiert in Salzlösung pH 3,8 ohne Fluorid oder in $n/1000$-Fluorid. 20°. Gasraum 10 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 60 Vol.-% Argon. Manometriegefäß für I: $v = 17{,}808$; $v_F = 7$. $k_{O_2} = 1{,}031$; $k_{CO_2} = 1{,}624$; $K_{O_2} = \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} - k_{O_2}} = 2{,}83$. Manometriegefäß für II: $v = 17{,}624$; $v_F = 7$. $k_{O_2} = 1{,}016$; $k_{CO_2} = 1.609$; $K_{O_2} = \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} - k_{O_2}} = 2{,}75$. Grünes Licht. Eingestrahlte Intensität 200 mm³ Quanten pro Minute. Ergebnis: Fast keine Hemmung der Photosynthese.

taminsäure gefunden. Infolge der autokatalytischen Entwicklung des Sauerstoffs[2] war also die Glutaminsäure im Lauf des Versuchs von 0 auf 86% des Normalwerts gestiegen. In der gleichen Zeit war die Photosynthese von einem sehr kleinen Wert auf 82% des Normalwerts gestiegen, wie man sieht, wenn man die Neigungen der beiden Kurven am Ende des Versuchs der Abb. 2 vergleicht. Diese quantitative Übereinstimmung zwischen Wiederaufbau der Glutaminsäure und Anstieg der Photosynthese — in derselben Zellsuspension, in demselben Gefäß, also unter identischen Bedingungen — ist ein Beweis für den Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Photosynthese, wie man ihn vollkommener sich nicht denken kann.

Indessen sind die chemischen Reaktionen der Glutaminsäure im Mechanismus der Photosynthese noch unbekannt. Keinesfalls kann die Reaktion

$CO_2 + \gamma$-Aminobuttersäure = Glutaminsäure

die Bindungsreaktion der CO_2 bei der Photosynthese sein, da ja, wie wir von Anfang an fanden, die Photosynthese um so mehr gehemmt wird, je mehr die γ-

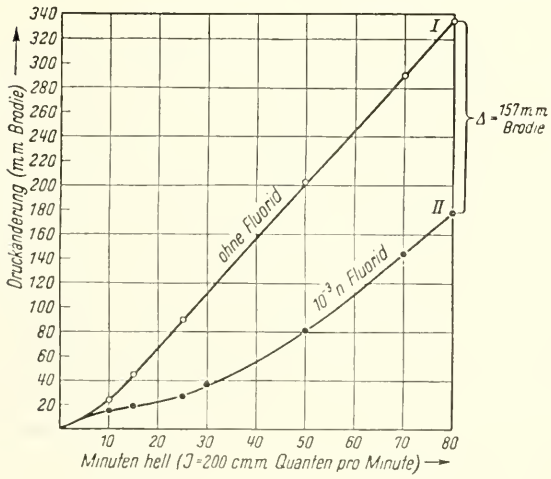


Abb. 2. Anaerober Versuch, allmählich in aeroben Versuch übergehend. Ist Fortsetzung von Versuch der Abb. 1, nach dessen Beendigung 10 Vol.-% CO_2, 90 Vol.-% Argon eingeleitet. Dann 50 Min. Anaerobiose im Dunkeln zur vollständigen Zersetzung der Glutaminsäure. Dann bei $t = 0$ Belichtung mit $J = 200$ wie im aeroben Versuch. Gefäßvolumina, Temperatur, pH wie im vorigen Versuch. Ergebnis: Anfangs sehr starke Photosynthese-Hemmung, die bei wachsendem Sauerstoffdruck und Wiederaufbau der Glutaminsäure kleiner und kleiner wird. Glutaminsäuregehalt am Anfang und Ende vgl. oben im Text.

Aminobuttersäure sich anhäuft. Dagegen tritt die aerobe dissoziierende CO_2 mehr und mehr in den Vordergrund des Interesses, jene große Menge dissoziierender CO_2, die bei Gegenwart von Sauerstoff aufgenommen und bei Entfernung des Sauerstoffs wieder abgespalten wird; und die in einem quantitativen Verhältnis zur Glutaminsäure steht. Denn läßt man die Glutaminsäure durch Fluorid oder durch Spuren von Chinon zur Hälfte zerfallen, so verschwindet mit der halben Glutaminsäure und mit der halben Photosynthese auch die Hälfte der aeroben dissoziierenden CO_2.

Methodisch ist zu den Versuchen zu bemerken, daß es zweckmäßig ist, so stark zu belichten, daß in der fluoridfreien Kontrolle der Sauerstoff-Sättigungsdruck in 10 Min. erreicht ist. Würde man so schwach belichten, daß die Erreichung des Sättigungsdrucks in der fluoridfreien Kontrolle 1 Stunde dauern würde, so würde in $n/1000$-Fluorid die Induktionszeit etwa 6 Stunden betragen, weil durch den Wiederaufbau der Glutaminsäure die Induktionszeit auf etwas das 6fache hinausgezogen wird. — Die Glutaminsäure wurde bestimmt durch Einkippen von 0,2 cm^3 0,4 normal Fluorid in 7 cm^3 Zellsuspension, nach Sättigung mit Argon am Anfang und nach Sättigung mit Luft am Ende der Versuche. Die CO_2-Entwicklung, die in 15 Min. beendet war, betrug ca. 35 mm^3 CO_2 (aus den eingesetzten 100 mm^3 Zellen), so daß die Genauigkeit der Bestimmung mehr als ausreichend war. — Alle notwendigen Daten zur Berechnung der manometrischen Versuche sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

Berechnung der manometrischen Versuche

Will man aus den Druckänderungen im Licht die Sauerstoffentwicklung berechnen — was überflüssig ist, da es nur auf das Verhältnis der Druckänderungen in Fluorid gegen die Kontrolle ankommt — so kann man ohne wesentlichen Fehler bei den hohen Lichtintensitäten $\gamma = -1$ setzen und also x_{O_2} nach der Gleichung

$$x_{O_2} = H \cdot K_{O_2} = H \cdot \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} - k_{O_2}} = H \cdot 2{,}8 \ [\mathrm{mm}^3]$$

berechnen.

Was das Verhältnis der Drucke anbetrifft, so ist in dem Versuch der Abb. 2 zu bedenken, daß beim Wiederaufbau der Glutaminsäure Kohlensäure gebunden wird. Der Betrag dieser Kohlensäure kann aus der Glutaminsäurezunahme während des Versuchs berechnet werden und ist, da 1,47 μMole Glutaminsäure neugebildet sind

$$x_{CO_2} = (1{,}47 \cdot 22{,}4) \cdot 1{,}5 = 49 \ \mathrm{mm}^3.$$

Die hierdurch in Gefäß + Fluorid bewirkte negative Druckänderung beträgt

$$\frac{-49}{k_{CO_2}} = \frac{-49}{1{,}61} = -30{,}5 \ \mathrm{mm}$$

während die Differenz der Druckänderungen der beiden Kurven in der ganzen Versuchszeit 157 mm beträgt. 80% der Differenz der Druckänderungen ist also durch die Hemmung der Photosynthese verursacht.

Literatur

1 Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 622.

2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 66.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY MASS.

47 Quantenbedarf der Photosynthese*

Von Otto Warburg und Walter Schröder

Bestimmt man den Quantenbedarf der Sauerstoffentwicklung mit der 2-Gefäßmethode und mit der Dithionitmethode, so findet man dieselben Quantenzahlen. Die Bedingungen, die den Quantenbedarf bestimmen, sind nunmehr festgelegt und werden beschrieben.

Wir haben unsere Bemühungen[1] fortgesetzt, die Bedingungen festzulegen, unter denen *Chlorella* das Licht gut oder schlecht ausnutzt. Die vorliegende Arbeit zeigt, wieweit diese Aufgabe nunmehr gelöst ist. Wir können jetzt immer und mit Sicherheit den Quantenbedarf 4 erzeugen; und wir finden häufig den Quantenbedarf 3, der bedeutet, daß im Rot etwa 90 % der vom Chlorophyll absorbierten Lichtenergie in chemische Energie verwandelt wird.

Da Licht freiverwandelbare Energie ist, kann thermodynamisch nichts gegen die Möglichkeit niederer Quantenzahlen eingewendet werden, wie es in den vergangenen Jahrzehnten oft geschehen ist. Offenbar war es ein irreführender Zufall[2], daß in den Vereinigten Staaten, in den Jahren 1939 bis 1947, gerade diejenigen hohen Quantenzahlen — 12 bis 20 — experimentell gefunden wurden, die von den dort aufgestellten Theorien über den Mechanismus der Photosynthese verlangt wurden. Mit diesen Theorien sind heute alle Einwände gegen die niederen Quantenzahlen zusammengebrochen.

Die Bedingungen der Zucht und Messungen, auf die es ankommt, sind im wesentlichen die folgenden:

1. Züchtet man *Chlorella* mit Metallfadenlicht und läßt man die Lampen dauernd brennen, so zwingt man die Zellen zu einer dauernden Nahrungsproduktion. Als Gegenmaßnahme senkt die Zelle die Ausnutzung des Lichts. Zellen, die gute Ausbeuten geben, entstehen nur dann, wenn das Licht wie in der freien Natur in seiner Intensität fluktuiert. Wir lassen deshalb bei der Züchtung das Licht durch automatische Änderung der Betriebsspannung der Lampe fluktuieren, und zwar so, daß wir 9 Stunden Tag, 9 Stunden Nacht und 2mal 3 Stunden Dämmerung haben. Es ist dabei nicht gleichgültig, in welcher Phase der 24stündigen Periode man die Zellen erntet. Morgens geerntete Zellen geben die besten Ausbeuten.

2. Zu einer Zeit, als wir die spektrale Reinheit des Meßlichts mehr und mehr steigerten, wurden die Ausbeuten schlechter und schlechter. Die Erklärung wurde in der Tatsache gefunden, daß Chlorella in ganz reinem rotem, gelbem oder grünem Licht fast keine Ausbeuten gibt, daß aber die guten Ausbeuten in wenigen Minuten erscheinen, wenn man zu dem Meßlicht eine kleine Menge blaugrünes Licht hinzufügt. Früher war es dabei notwendig[3], das blaugrüne Licht in Intervallen von 30 Minuten hinzuzufügen und wieder fortzunehmen. Die nach den heutigen Vorschriften gezüchteten Zellen verlangen dieses Intermittieren, das unverständlich war, nicht, vielmehr können wir heute bei der Messung des Quantenbedarfs 6 Stunden kontinuierlich mit konstanter Intensität belichten und erhalten dann eine fast gradlinige Sauerstoffentwicklung (Abb. 1 und 2).

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Band 12b, (1957): 716.

3. Mißt man den Quantenbedarf für dichte Zellsuspensionen, so erhalten die Zellen, die sich an der Eintrittsstelle des Lichtstrahls befinden, das meiste Licht, während die Zellen an der Austrittsstelle des Strahls fast kein Licht erhalten. Da die Manometriegefäße schnell geschüttelt werden müssen, so werden die Zellen in den dichten Suspensionen dauernd vom Licht in die Dunkelheit und umgekehrt getrieben. Die Folge davon sind photochemische Induktionen, bei denen immer Energie verloren werden kann. Es gehört deshalb zu unseren optimalen Bedingungen, daß das Licht beim Durchgang durch die Manometriegefäße an Intensität nur sehr wenig abnehmen darf, was bedeutet, daß man mit sehr dünnen Zellsuspensionen arbeiten muß. Wir lassen heute nur 3 bis 4 % des eingestrahlten Lichts in den Manometriegefäßen absorbieren. Das Problem, geringe Lichtabsorptionen

Datum	$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{MoleQuanten}}{\text{Mole } O_2}$	Datum	$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{MoleQuanten}}{\text{Mole } O_2}$
1. 3.	4,10	3. 4.	4,75
4. 3.	3,68	9. 4.	4,26
5. 3.	3,65	10. 4.	4,65
6. 3.	3,58	11. 4.	4,30
7. 3.	4,30	15. 4.	7,51
14. 3.	3,65	17. 4.	3,92
21. 3.	4,10	23. 4.	3,54
22. 3.	3,22	24. 4.	2,92
25. 3.	4,61	25. 4.	3,20
27. 3.	3,90	26. 4.	4,62
29. 3.	3,56	2. 5.	3,70
1. 4.	3,48		—

Tab. 1. Serie von 23 φ-Bestimmungen.

in trüben Medien zu messen, ist deshalb in den letzten Jahren vordringlich geworden. Mit Hilfe der Ulbrichtschen Kugel[4] und eingebautem Zeiss'schen Elektronen-Multiplier ist es heute vollständig gelöst. Lichtabsorptionen in *Chlorella*, die nur 3 bis 4 % des eingestrahlten Lichts betragen, können wir heute mit einer Genauigkeit von 3 % des Absorptionswerts messen.

Von weiteren Bedingungen sei das Vanadium erwähnt, dessen Notwendigkeit Arnon[5] entdeckt hat. Wir fanden, daß das zugesetzte Vanadium 5wertig sein muß und daß sich im Licht aus dem 5wertigen leicht das 4wertige unwirksame Vanadium bilden kann. Wir setzen deshalb 5wertiges Vanadium (als $NaVO_3$) nicht nur bei der Kultur zu, sondern außerdem immer vor der Messung des Quantenbedarfs.

Im übrigen sollen die Zellen jung, die Kulturen 1tägig sein und sie sollen nicht zuviel Chlorophyll enthalten, da in älteren chlorophyllreichen Zellen ein Teil des Chlorophylls photochemisch inaktiv ist. Die Zellen sollen bei der Übertragung aus den Kulturgefäßen in die Manometriegefäße nicht zentrifugiert werden. Die Zellsuspensionen der Kultur werden also direkt, nur nach Zusatz von Vanadium, in die Manometriegefäße überpipettiert.

Tab. 1 zeigt, wie regelmäßig die Ergebnisse sind, wenn man nach unseren Vorschriften züchtet und mißt. Für die Zellen eines unserer Kulturbecken wurde in

23 Versuchen, bei denen jedesmal 5 bis 5 Stunden kontinuierlich belichtet wurde, der Quantenbedarf gemessen. Alle Versuche sind in der Tabelle angeführt. Die Meßmethode war die 2-Gefäßmethode. Die Summe der manometrischen Ausschläge betrug + 492 mm in dem kleinen Gefäß und + 132 mm in dem großen Gefäß; bei der Berechnung des Mittelwerts waren demnach die Ablesefehler so gut wie eliminiert. Wir fanden, wenn die Ruheatmung addiert wurde, die aus Tab. 1 ersichtlichen Werte.

Der Mittelwert ist 4,06. Nur *ein* Versuch, dessen $1/\varphi = 7{,}5$ ist, fällt aus der Reihe heraus. In 13 Versuchen ist der Quantenbedarf kleiner als 4.

In den Abb. 1 und 2 sind 2 Versuche beschrieben. Der Versuch der Abb. 1 wurde gewählt als Beispiel eines methodisch einwandfreien Versuchs, bei dem der

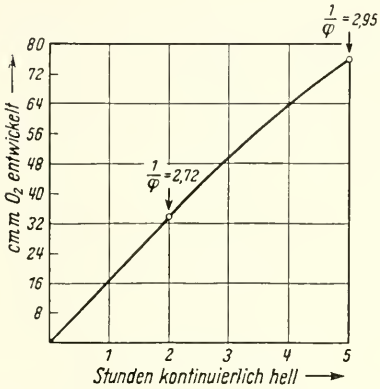


Abb. 1. (Protokoll 1). Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffentwicklung aus 3,5 mm³ *Chlorella* (2-Gefäßmethode).

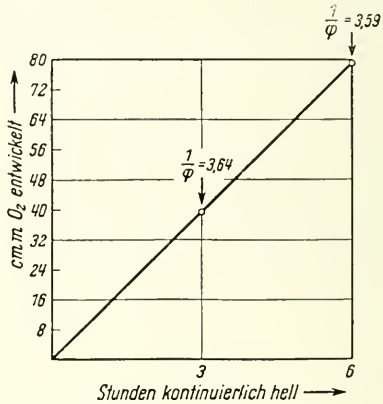


Abb. 2. (Protokoll 2). Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffentwicklung aus 3,5 mm³ steril gezüchteter *Chlorella* (2-Gefäßmethode).

Quantenbedarf 3 ist. Die Besonderheit des Versuchs der Abb. 2 ist, daß die *Chlorella* aus einer einzelnen Zelle unter sterilen Bedingungen herangezüchtet worden war. Beide Versuche zeigen die fast geradlinige Sauerstoffentwicklung im Verlauf von 5 bis 6 Stunden.

Die 2-Gefäßmethode, mit der bisher die Sauerstoffentwicklung gemessen worden ist, setzt voraus, daß in den beiden Gefäßen chemisch dasselbe vor sich geht. Alles, bis auf die Volumina, muß in den beiden Gefäßen gleich sein. Gleich müssen die eingestrahlten Lichtintensitäten sein und gleich müssen auch die Absorptionen, d. h. die Zelldichten und die Grundflächen der Gefäße sein. Dies erfordert die Teilung sowohl des Meßlichts als auch des blaugrünen Lichts und die bolometrische Justierung von vier Lichtstrahlen, und damit Einrichtungen, die unsres Wissens zur Zeit nur in Dahlem vorhanden sind. EMERSONS irrtümliche Entdeckung des CO_2-Ausstoßes zu Beginn der Photosynthese ist ein Beispiel dafür, wohin die unsachgemäße Handhabung der Methode führen kann. Statt zwei Gefäße gleichzeitig zu belichten, belichtete EMERSON beide Gefäße in Zeitintervallen, die 8 bis 24 Stunden auseinanderlagen.

Man benötigt nur *ein* belichtetes Gefäß, wenn man den im Licht entwickelten Sauerstoff mit Dithionit[6] bestimmt. Der Hauptraum (Abb. 3) enthält die Zellen, die Birne das Dithionit, das zur Zeit Null in ein Dunkelgefäß und nach der Belichtung in ein Hellgefäß eingekippt wird.

Abb. 3. Gefäß zur Bestimmung des Quantenbedarfs mit Dithionit. Volumen etwa 33 cm³. *Hauptraum:* 3 bis 4 mm³ Zellen, suspendiert in 7 cm³ Kulturlösung, auf pH 3,8 angesäuert. *Birne:* 20 mg $Na_2S_2O_4$ + 20 mg $CaCl_2$. *Gasraum:* 10 Vol.-% CO_2, 2,5 Vol.-% O_2, 87,5 Vol.-% Argon.

Wir fanden in 6 1stündigen Versuchen (Protokoll 4) die folgenden Druckzunahmen des Sauerstoff-Partialdrucks und damit den Quantenverbrauch:

Versuch	Druckzunahme in 60′ Belichtung [mm]	$\frac{1}{q} = \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Mole } O_2}$
1	+ 4,5	3,80
2	+ 4,5	4,96
3	+ 5,0	4,27
4	+ 6,0	3,72
5	+ 5,5	3,98
6	+ 5,0	4,06
	Σ 30,5	Mittel 4,13

Tab. 2. q-Bestimmungen mit der Dithionitmethode.

Das Ergebnis ist, daß man mit Dithionit denselben Quantenverbrauch findet, wie mit der 2-Gefäßmethode. Doch ziehen wir die 2-Gefäßmethode vor, da sie den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffentwicklung gibt, und zwar mit einer Genauigkeit, die unabhängig vom Partialdruck des Sauerstoffs ist; während die Dithionitmethode alle Nachteile einer Differenzmethode hat. Im übrigen ist natürlich auch die Dithionit-Methode nicht fool-proof. Die Methode und ihre möglichen Fehler sind ausführlich in Protokoll 4 beschrieben.

Zum Schluß sei hervorgehoben, daß nicht nur der Quantenbedarf der Photosynthese, sondern auch der Quantenbedarf der Lichtreaktion — der 1 ist — nunmehr immer mit den Zellen gemessen wird, die nach den Vorschriften dieser Arbeit mit fluktuierender Lichtintensität gezüchtet worden sind. Ein Versuch mit diesen Zellen, die die lichtinduzierte Atmung besonders schön zeigen, ist in Protokoll 5 mitgeteilt.

Protokolle

Allgemeine Vorbemerkungen

Näheres über die *Fluktuation des Lichts*[1] findet man in einer früheren Arbeit, und zwar war es die Fluktuation nach Abb. 2 dieser Arbeit, die sich besser bewährt hat und die den natürlichen Bedingungen besser entspricht. Die Betriebsspannung der 300-Watt-Metallfadenlampe stieg morgens in 3 Stdn. von 50 V auf 220 V, blieb dann 9 Stdn. auf 220 V, sank in 3 Stdn. auf 50 V und blieb dann 9 Stdn. auf 50 Volt. Die Zellen wurden am Ende der 9stdg. 50-V-Phase zur Messung des Quantenbedarfs benutzt.

Das *Meßlicht* war grün und wurde aus einer 500-W-Kinolampe mit Linsen und Filtration durch 20 mm 10proz. $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mm Orangeglas Nr. 1 + 10 mm Didymglas der Firma Schott-Mainz gewonnen. Blaugrün war der Bezirk um 470 mμ; er wurde aus einer 300-W-Xenon-Hochdrucklampe und Filtration durch 20 mm 10proz. $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mm Blauglas Nr. 12 + Interferenzfilter von Schott-Mainz gewonnen.

Zur *Teilung und Justierung*[3] der Strahlen ist hinzuzufügen, daß zur Justierung des Blaugrüns nicht mehr Kaliumchromat, sondern H_2PtCl_6 verwendet wird, das im Licht beständiger ist.

Zur Messung der *Absorption* mit der Ulbrichtschen Kugel[1] ist hinzuzufügen, daß die Manometriegefäße mit aufgesetzten Helmen in die Kugel gebracht werden und daß die Helme innen mit Flußsäure aufgerauht sind. Natürlich müssen dann die Helme bei der manometrischen Messung gleichfalls aufgerauht sein. — Wie bereits in der Einleitung erwähnt, benutzen wir als Detektor nicht mehr die Selenzelle, sondern einen Elektronen-Multiplier der Firma Zeiss-Opton, wodurch es möglich wurde, die geringen Lichtabsorptionen mit einer Genauigkeit von 3% des Absorptionswertes zu messen. Die Absorption wurde am Anfang und am Ende der Versuche gemessen und im allgemeinen gleich gefunden. Hatte sie zugenommen, so wurde für die Berechnung des Quantenbedarfs das Mittel von Anfang und Ende eingesetzt. — Arbeitet man mit der 2-Gefäßmethode, so überzeuge man sich davon, daß die Licht-Absorption in den beiden Gefäßen gleich ist. Damit ist dann auch die Gleichheit der Grundflächen der beiden Gefäße bewiesen, da die Zelldichten gleich sind.

Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist früher[3] beschrieben. Je 250 cm^3 Kulturmedium (+ Mikroelemente) wurden in die Kulturkolben gegeben, die mit 5 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 65 Vol.-% Argon so schnell durchströmt wurden, daß die Zellen nicht sedimentierten. Die Zellen zur Saat wurden bei 20° mit 2mal 200-Metallfadenlampen gezüchtet, die 20 cm von den Zuchtkolben entfernt waren. Die Lampen brannten kontinuierlich, die Zellen vermehrten sich in 48 Stdn. von 60 auf 1660 mm^3. Sie wurden zentrifugiert, mit frischer Kulturlösung aufgeschwemmt, und dann bei 20° mit fluktuierendem Licht für die Messung gezüchtet, wobei sie sich in 24 Stdn. von 60 auf 125 mm^3 vermehrten. Nach Zusatz von 100 γ Vanadium als $NaVO_3$ wurden je 7 cm^3 dieser Suspension in die Manometriegefäße pipettiert. War die Absorption in der Ulbrichtschen Kugel gemessen, so wurde bei 20° der Quantenbedarf gemessen.

Protokoll 1 (Versuch der Abb. 1) 2-Gefäßmethode

Manometrie. 20°. In jedem Gefäß 3,5 mm³ Zellen, suspendiert in 7 cm³ Kulturlösung. Im Gasraum 10 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 60 Vol.-% Argon. Kleines Gefäß $v' = 16{,}884$ cm³; $v_F' = 7$ cm³; großes Gefäß $v = 21{,}05$ cm³; $v_F = 7{,}0$ cm³.

$$x_{O_2} = H' \cdot 8{,}595 - H \cdot 11{,}05,$$
$$x_{CO_2} = -H' \cdot 12{,}46 + H \cdot 18{,}00.$$

Licht. Grün eingestrahlt 24,8 mm³ Quanten pro Min., davon 3,3% absorbiert; Blaugrün eingestrahlt 0,95 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 20 Prozent.

Druckänderungen [mm]

	im kleinen Gefäß	im großen Gefäß
120′ hell	+ 9	+4
180′ hell	+12	+5,5
300′ hell	+21	+9,5

Gaswechsel: für die ersten 2 Std.:

$$x_{O_2} + 33{,}2 \text{ mm}^3;\ x_{CO_2} - 40 \text{ mm}^3.$$

für die ganze Zeit (5 Stdn.):

$$x_{O_2} + 75{,}5 \text{ mm}^3;\ x_{CO_2} - 90{,}5 \text{ mm}^3.$$

Quantenverbrauch für die ersten 2 Stunden

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{120 \cdot 24{,}8 \cdot 0.033 + {}^1/_2 \cdot 120 \cdot 0{,}95 \cdot 0{,}2}{33{,}2 + 2 \cdot 3{,}5} = 2{,}72.$$

Quantenverbrauch für die ganze Zeit

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{300 \cdot 24{,}8 \cdot 0{,}033 + {}^1/_2 \cdot 300 \cdot 0{,}95 \cdot 0{,}2}{75{,}5 + 5 \cdot 3{,}5} = 2{,}95.$$

Erläuterung zu der Berechnung des Quantenbedarfs: Weil die Wellenlänge 470 mμ nur zur Hälfte[7] von dem Chlorophyll absorbiert wird, sind im Blaugrün die absorbierten Quanten mit ½ multipliziert. Würde man im Blaugrün statt der halben die ganze Absorption einsetzen, so würde der Quantenverbrauch für die ganze Zeit nicht 2,95, sondern 3,3 betragen.

Die Ruheatmung der Versuchszellen betrug, wie mit 100 mm³ Zellen festgestellt wurde, 100 mm³ Sauerstoff pro Stde.; also das einfache Zellvolumen pro Stunde. Deshalb ist für die Atmung in der ganzen Zeit $5 \cdot 3{,}5 = 17{,}5$ mm³ eingesetzt worden. Die positive Sauerstoffentwicklung betrug also das 4,3fache der Atmung oder die gesamte Sauerstoffentwicklung das 5,3fache der Atmung. In Wirklichkeit ist die Zellatmung, abgesehen von der lichtinduzierten Atmung, in den 5 Stdn. Belichtung höher, als die Ruheatmung, so daß bei der Berechnung des Quantenverbrauchs eine zu kleine Atmung eingesetzt ist.

Protokoll 2 (Versuch der Abb. 2). Sterile Zellkultur. 2-Gefäßmethode

Anders als in dem Versuch des Protokolls 1 waren die Saatzellen aus einer einzelnen *Chlorella* unter sterilen Bedingungen herangezüchtet worden. *Manometrie.* 20°. In jedem Gefäß 3,5 mm³ Zellen, suspendiert in 7 cm³ Kulturlösung. Im Gasraum 10 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 60 Vol.-% Argon. Kleines Gefäß: $v' = 15{,}519$ cm³; $v_F = 7{,}0$ cm³. Großes Gefäß: $v = 21{,}630$ cm³; $v_F = 7{,}0$ cm³.

$$x_{O_2} = H' \cdot 4{,}68 - H \cdot 6{,}55,$$
$$x_{CO_2} = -H' \cdot 6{,}68 + H \cdot 11{,}33.$$

Licht: Grün eingestrahlt 24,9 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 3,6 Prozent. Blaugrün (470 mμ) eingestrahlt 1,0 Quanten pro Min., davon absorbiert 20 Prozent.

Druckänderungen [mm]

	Kleines Gefäß	Großes Gefäß
180′ hell	+15	+5
180′ hell	+14,5	+4,5
360′ hell	+29,5	+9,5

Gaswechsel [mm³]. In den ersten 3 Stdn.

$$x_{O_2} + 38{,}8;\ x_{CO_2} - 43{,}4;\ \gamma - 1{,}12.$$

In den zweiten 3 Stdn.

$$x_{O_2} + 40{,}0;\ x_{CO_2} - 46{,}0;\ \gamma - 1{,}15.$$

Quantenbedarf für die ersten 3 Stdn.:

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{180 \cdot 24{,}9 \cdot 0{,}036 + {}^1/_2 \cdot 180 \cdot 1 \cdot 0{,}2}{38{,}8 + 3 \cdot 3{,}5} = 3{,}64$$

Quantenbedarf für die ganze Zeit (6 Stdn.):

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{360 \cdot 24{,}9 \cdot 0{,}036 + {}^1/_2 \cdot 360 \cdot 1 \cdot 0{,}2}{78{,}8 + 6 \cdot 3{,}5} = 3{,}58.$$

Die steril gezüchteten Zellen gaben also keine besseren Ausbeuten, als die nicht steril gezüchteten. Man muß dabei bedenken, daß in den nicht sterilen Kulturen Bakterien erst merklich auftreten, wenn pH über 5 steigt und daß die Saatzellen, wenn man sie abzentrifugiert und in frischer saurer Kulturlösung suspendiert, nur sehr wenig Bakterien enthalten.

Protokoll 3 (Tab. 1). 23 5- bis 6stündige Versuche, 2-Gefäßmethode

Manometrie: Wie in Protokoll 2. 3,5 mm³ Zellen in 7 cm³. $v' = 15{,}519$; $v = 21{,}630$ cm³. 20°. 10 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 60 Vol.-% Argon.

Licht: Grün eingestrahlt 24,8 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 3,6 Prozent. Blaugrün (470 mμ) eingestrahlt 0,95 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 20 Prozent.

Druckänderungen [mm]

In 23 Versuchen = 136 Stdn. = 8160 Min.

Kleines Gefäß	Großes Gefäß
+492	+132

Gaswechsel (in 136 Stdn.)

$$x_{O_2} = +492 \cdot 4{,}68 - 132 \cdot 6{,}55 = +1478 \text{ mm}^3,\ \gamma = -1{,}21.$$

$$x_{CO_2} = -492 \cdot 6{,}68 + 132 \cdot 11{,}33 = -1790 \text{ mm}^3$$

Quantenbedarf (in 136 Stdn.)

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{8160 \cdot 24{,}8 \cdot 0{,}036 + {}^1/_2 \cdot 8160 \cdot 0{,}95 \cdot 0{,}2}{1478 + 136 \cdot 3{,}5} = 4{,}1.$$

Protokoll 4. Versuche mit der Dithionit-Methode

24stdg. Zellkulturen, wie in dem Versuch des Protokolls 1 gezüchtet, werden mit Schwefelsäure auf pH 3,8 angesäuert und mit 100 γ Vanadium (als $NaVO_3$) pro *l* versetzt. Je 7 cm³ werden in 2 Gefäße von der Form der Abb. 3 eingefüllt, die gleich groß sein müssen. Die Birnen enthalten 20 mg $Na_2S_2O_4$ + 20 mg $CaCl_2$, der Gasraum enthält 10 Vol.-% CO_2, etwa 2,5 Vol.-% O_2 und als indifferentes Gas Argon. Die Temperatur ist 20°. Kippt man die Salze in dem einen Gefäß zur Zeit Null ein und in dem andern Gefäß nach 60 Min. Belichtung, so erhält man 2 negative Drucke h_0 und h, von denen der negative Druck nach Belichtung größer ist, wenn im Licht Sauerstoff entwickelt worden ist. Bei schnellem Schütteln ist der größte Teil des Sauerstoffs nach wenigen Minuten absorbiert, doch wartet man mit dem Ablesen des Endwerts 10 Minuten. Die Sauerstoffentwicklung beträgt dann:

$$x_{O_2} = (h_0 - h)\, k_{O_2}$$

wo k_{O_2} die einfache Gefäßkonstante für Sauerstoff ist. Um die Anordnung zu prüfen, macht man eine Bestimmung von x_{O_2} ohne Zellen. Dann muß x_{O_2} gleich Null sein.

Da die Salze immer etwas Bicarbonat enthalten, und da die Salze die Löslichkeit der CO_2 herabsetzen, wird beim Einkippen immer CO_2 in den Gasraum getrieben die den durch Sauerstoffabsorption erzeugten negativen Druck verkleinert. Sind die Gefäße gleich groß, so hebt sich dieser Gegendruck in der Differenz $(h_0 - h)$ heraus.

Enthält der Hauptraum Zellen, so wird auch aus den Zellen CO_2 beim Einkippen der Salze ausgetrieben[8]. Der Gegendruck, der hierdurch entsteht, hebt sich in $h_0 - h$ nur dann heraus, wenn beim Einkippen beide Gefäße dunkel oder beide Gefäße hell waren. Andernfalls ist der Gegendruck verschieden, weil im Licht die aerobe dissoziierende CO_2 kleiner ist, als im Dunkeln. Hat man nur einige Zellen im Hauptraum und ist die Lichtintensität niedrig, so ist der hierdurch entstehende Fehler von der Größenordnung einiger 1/10 mm³ und kann in der Regel vernachlässigt werden. In anderen Fällen z. B. wenn man 100 mm³ Zellen im Hauptraum hat, muß die Korrektur berücksichtigt werden. Sie wird dann mit Hilfe von $n/80$-Fluorid — ohne $Na_2S_2O_4$ — bestimmt.

Enthalten die Manometrie-Kästchen zuviel Flüssigkeit, so können beim Schütteln Flüssigkeitsstäubchen in die Birne einspritzen, die bewirken, daß das Dithionit in der Birne Sauerstoff absorbiert. Wir benutzen deshalb große Manometriekästchen von 33 cm³ Inhalt. In Versuchsdauern von 1 Stde. haben wir dann keine Fehler durch Einspritzen beobachtet. Doch ist dies der schwache Punkt der Methode und man muß für jede neue räumliche und zeitliche Anordnung durch Kontrollen ohne Zellen prüfen, daß $h_0 - h$ gleich Null ist.

Beispiele

Manometrie.

Gefäß I	$v = 33{,}212$	$v_F = 7{,}00$ cm³	$k_{O_2}^{20^0} = 2{,}46$
Gefäß II	$v = 33{,}025$	$v_F = 7{,}00$ cm³	$k_{O_2}^{20^0} = 2{,}45$

Nr.	Zellen [mm³]	Grün absorbiert [%]	Blaugrün absorbiert [%]	h_0 [mm]	h [mm]	$(h_0 - h)$ [mm]	$(h_0 - h)\, k_{O_2}$ [mm³]	$\frac{1}{q} = \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Mole } O_2}$ (Nach Addition der Atmung)
1	3,5	3,3	19	—215,5	—220	4,5	11,0	3,80
2	4,0	4,5	25	—215,5	—220	4,5	11,0	4,96
3	4,0	4,2	24	—218,0	—223	5,0	12,3	4,27
4	4,0	4,2	24	—220,5	—226,5	6,0	14,7	3,72
5	4,0	4,2	24	—219,5	—225	5,5	13,5	3,98
6	4,0	4,0	23	—218,0	—223	5,0	12,3	4,00
						+30,5		Mittel 4,13

Tab. 3. Versuche mit der Dithionitmethode, q-Berechnung wie in den Protokollen 1, 2 und 3

Licht. 60 Min. Grün eingestrahlt 24,8 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert vgl. Tab. 3. Blaugrün (470 mμ) eingestrahlt 1,0 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert vgl. Tab. 3.

Protokoll 5 (mit G. Krippahl)

Die Zellen wurden mit fluktuierender Lichtintensität gezüchtet und vermehrten sich in 20 Stdn. von 60 auf 178 mm³. 100 mm³ Zellen enthielten 1 Mikromol Chlorophyll. Die Zellen wurden 2mal in Salzlösung „S" gewaschen und dann in der Salzlösung „S" suspendiert. Die Zelldichte betrug 100 mm³ Zellen in 7 cm³ Salzlösung.

Salzlösung „S". 5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 2,5 g KH_2PO_4; 2,0 g NaCl; 0,2 g NH_4Cl; mit Wasser auf 1000 cm³; mit Schwefelsäure auf pH 3,8 angesäuert.

Manometrie. 2-Gefäßmethode. Kästchen. 20⁰. Gasraum 10 Vol.-% CO_2, 30 Vol.-% O_2, 60Vol.-% Argon.

$$v' = 16{,}759; \quad v_F' = 7{,}00 \text{ cm}^3.$$
$$k'_{O_2} = 0{,}931; \quad k'_{CO_2} = 1{,}519 \text{ mm}^2.$$
$$v = 32{,}08; \quad v_F = 7{,}00 \text{ cm}^3.$$
$$k_{O_2} = 2{,}356; \quad k_{CO_2} = 2{,}944 \text{ mm}^2.$$
$$x_{O_2} = H' \cdot 3{,}94 - H \cdot 7{,}61,$$
$$x_{CO_2} = -H' \cdot 4{,}92 + H \cdot 12{,}48.$$

Licht. Grün aus Kinolampe 500 W wie in Protokoll 1. Eingestrahlt 30,6 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 81,03 Prozent. Blaugrün 60 W Metallfandenlampe mit Blaufilter in 45 cm

Entfernung von den Gefäßen. Eingestrahlt 1 mm³ Quanten pro Min., davon absorbiert 100 Prozent.

Vorbehandlung. Die Zellen wurden zunächst 2 Stdn. im Thermostaten geschüttelt, um die Ruheatmung zu verkleinern.

Wir fanden (bg = blaugrün, h = grün + blaugrün, Berechnung nach Z. Naturforschg. 9b, 769 (1954).

	Großes Gefäß [mm]	Kleines Gefäß [mm]			
5′bg	—0,5	—2,0			
			H	H'	
	$I_{grün}$ = 30,6	$I_{grün}$ = 30,6	0,1	0,4	x_{O_2} + 15,6
			0,5	3,5	x_{CO_2} — 16,5
1′bg 1′h 1′bg	+0,5	+3,5	0,4	2,0	
5′bg	—1,0	—5,0	+1,0	+5,9	
5′bg	—1,0	—4,0			
15′bg	—1,0	—5,5			
5′bg	0	—1,0	H	H'	
	$I_{grün}$ = 30,6	$I_{grün}$ = 30,6	0	0,2	x_{O_2} +33,3
			1,0	6,5	x_{CO_2} — 34,8
1′bg 3′h 1′bg	+1,0	+6,5	1,2	6,0	
5′bg	—1,5	—7,5	+2,2	+12,7	
5′bg	—1,0	—4,5			
15′bg	—1,5	—6,0			
5′bg	—0	—1,5			

Berechnung von $\frac{1}{q}$

$$\text{Für 3 Min.: } \frac{1}{q} = \frac{I \cdot 3 \cdot a}{x_{O_2}} = \frac{30{,}6 \cdot 3 \cdot 0{,}81}{33{,}3} = 2{,}24.$$

$$\text{Für 1 Min.: } \frac{1}{q} = \frac{I \cdot 1 \cdot a}{x_{O_2}} = \frac{30{,}6 \cdot 0{,}81}{15{,}6} = 1{,}59.$$

$$\text{Für } t = 0 \text{ Min. graphisch: } \frac{1}{q} = 0{,}9.$$

Man beachte den Anstieg der Atmung infolge der Belichtung. Wurde 1 Min. belichtet, so war die Atmung in 5 Min.

nach der Belichtung	—1	—5 mm	x_{O_2} — 12,1 mm³;	x_{CO_2} = + 12,1,
vor der Belichtung	—0,5	—2,0 mm	x_{O_2} — 4,08 mm³;	x_{CO_2} = + 3,6.

Wurde 3 Min. belichtet, so war die Atmung in 5 Min.

nach der Belichtung	—1,5	—7,5 mm	x_{O_2} —18,1 mm³;	x_{CO_2} +18,3,
vor der Belichtung	0	—1,0 mm	x_{O_2} — 3,94 mm³;	x_{CO_2} + 4,9.

Die Atmung stieg also durch 1 Min. Belichtung von 4 auf 12 und bei 3 Min. Belichtung von 4 auf 18.

Der respiratorische Quotient der lichtinduzierten Atmung war sehr nahe gleich — 1.

Literatur

1 Warburg, O., Schröder, W., und Gattung, H. W., Z. Naturforschg. 11b (1956), 654.

2 Franck, James, und Gaffron, H., Advances in Enzymol. 1 (1941), 199: "We know now that the high efficiency is only apparent and that the true efficiency is probably only a third of it, namely 12 quanta per molecule CO_2 reduced."

3 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 10b (1955), 631.

4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.

5 Arnon, D., Nature (London) 172 (1953), 1039.

6 Warburg, O., und Krippahl, G., Liebigs Ann. Chem. 604 (1957), 94.

6 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.

7 Warburg, O., und Negelein, E., Z. phys. Chem. 106 (1923), 191.

8 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 11b (1956), 71b.

48 D-(—)-Milchsäure in *Chlorella**

Von Otto Warburg, Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

Die Milchsäuregärung der *Chlorella* ist eine D-Milchsäuregärung. Es folgt daraus, daß die „Milchsäuredehydrase" der *Chlorella* im Gegensatz zur Milchsäuredehydrase des Muskels, ein D-Ferment ist. Dabei ist es nicht die Konfiguration des Pyridinnucleotids, sondern des Apoferments, das die Konfiguration der entstehenden Milchsäure bestimmt. Andere D-Fermente haben wir bisher in *Chlorella* nicht gefunden.

Die anaerobe Milchsäurebildung in *Chlorella* ist in der letzten Zeit interessant geworden, weil Milchsäure, durch Verschiebung des pH-Wertes in *Chlorella*, das Ferment aktiviert, das Glutaminsäure in γ-Aminobuttersäure und Kohlensäure spaltet. Die hemmende Wirkung langdauernder O_2-Entziehung auf die Photosynthese ist wahrscheinlich durch die Glutaminsäure-Zersetzung verursacht, wozu stimmt, daß bei Zugabe von Sauerstoff mit dem Wiederaufbau der Glutaminsäure auch die Photosynthese wieder erscheint. Demgegenüber hat die sofortige Hemmung der Photosynthese bei O_2-Entzug mit Milchsäurebildung nichts zu tun, sondern ist eine Folge des Ausfalls der induzierten Atmung.

Wie alle Lebensäußerungen der *Chlorella*, so hängt auch die Milchsäuregärung in hohem Maß von den Bedingungen ab, unter denen die *Chlorella* gezüchtet wird. Am stärksten gären die chlorophyllarmen mit sehr intensivem Licht gezüchteten Zellen. Sie haben einen Q-Wert von etwa 6, während normal gezüchtete chlorophyllreichere Zellen Q-Werte von 0,5 bis 0,7 haben.

Bei der näheren Untersuchung der Milchsäuregärung der *Chlorella* haben wir gefunden, daß es D-(—)-Milchsäure ist, die bei der Gärung entsteht. Da wir früher gefunden haben[1], daß die Milchsäure bei der Gärung durch die Reaktion:

Brenztraubensäure + Dihydro-nikotinsäureamid
= Milchsäure + Nikotinsäureamid

entsteht, so ist also die Milchsäuredehydrase der *Chlorella* ein D-Ferment, sei es wegen der Konfiguration der prosthetischen Gruppe — des Pyridinnucleotids — sei es wegen der Konfiguration des Apoferments.

Der Versuch hat ergeben, daß es die Konfiguration des Apoferments ist, die die Konfiguration der Milchsäure bestimmt. Hydrieren wir Brenztraubensäure mit *Chlorella*-Extrakt oder mit Muskel-Milchsäuredehydrase, in beiden Fällen mit demselben Dihydro-diphospho-pyridinnucleotid, so erhalten wir im ersten Fall D-Milchsäure, im zweiten Fall L-Milchsäure.

Wir haben bisher in Chlorella keine andern D-Fermente gefunden. Zum Beispiel liefert die Äpfelsäuredehydrase der *Chlorella* bei der Hydrierung der Oxaloessigsäure L-Äpfelsäure. Die Glutaminsäure-Decarboxylase der *Chlorella* ist ein reines L-Ferment, sie bringt von den beiden isomeren Glutaminsäuren nur die L-Glutaminsäure zum Zerfall. Alanin, von dem *Chlorella* sehr viel in freiem oder lose gebundenem Zustand erhält, ist nicht D-Alanin, sondern L-Alanin, da es durch die D-Aminosäureoxydase nach Krebs nicht oxydiert wird.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 12b (1957): 722.

In den entscheidenden Versuchen haben wir die Milchsäure als Zinksalz isoliert. Doch kann man einfacher die D-Konfiguration der Milchsäuredehydrase der *Chlorella* optisch demonstrieren, indem man zu einer Lösung von Pyridinnucleotid (Böhringer, $[\alpha]_D \sim -30^0$) und *Chlorella*-Extrakt die beiden isomeren Milchsäuren gibt. Dann nimmt die Lichtabsorption bei 340 mμ wesentlich nur bei Zugabe der D-Milchsäure zu, da nur die D-Milchsäure zu Brenztraubensäure dehydriert wird (Abb. 1).

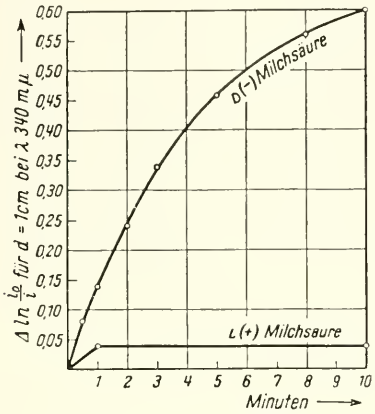


Abb. 1. Verhalten von D- und L-Milchsäure zu Milchsäuredehydrase der *Chlorella*. 2,5 cm³ m/20-Pyrophosphat (pH 7), 10 mg Diphosphopyridin-nucleotid, 2 mg milchsaures Calcium, D- oder L-Verbindung. Bei t_0 0,1 cm³ einer Ammonsulfatfraktion von *Chlorella*-Extrakt, die zwischen 0,35 und 0,55 Sättigung ausfiel.

Einen ähnlichen Versuch haben wir früher mitgeteilt[2], aber mit Milchsäuredehydrase aus Muskeln und aus Tumoren. Damals wurde, umgekehrt wie hier, nur die L-Milchsäure, nicht aber die D-Milchsäure dehydriert.

Zum Schluß bemerken wir, daß sich bei diesen Versuchen steril gezüchtete *Chlorella* ebenso verhielt, wie nicht steril gezüchtete.

Versuche

1. D-(—)-Milchsäure aus Brenztraubensäure mit Chlorella-Extrakt. 35 mg brenztraubensaures Natrium = 0,318 mMole wurden in 75 cm³ *m*/15-Natriumpyrophosphat pH 6,2 gelöst. 0,32 mMole des Natriumsalzes des Dihydro-diphospho-pyridin-nucleotids (Böhringer) und 4 cm³ *Chlorella*-Extrakt wurden hinzugefügt. pH des Gemisches war dann 6,4, das Gesamtvolumen 79 cm³. Das Gemisch blieb 48 Stdn. bei 0⁰ stehen, pH war dann 6,45. Der optische Test zeigte, daß das hydrierte Pyridinnucleotid fast vollständig reagiert hatte.

„*Chlorella*-Extrakt": 2000 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 6 cm³ Wasser, wurde 30 Min. bei 0⁰ im Homogenisator behandelt. Dann wurde 30 Min. hochtourig zentrifugiert. Die überstehende schwach grünliche Lösung enthielt die D-Milchsäuredehydrase. Der Extrakt kann in diesem Zustand verwendet werden; oder es kann die Ammonsulfatfraktion von 0,35 bis 0,55 Sättigung verwendet werden, in der das Ferment in 20fachem Reinheitsgrad vorliegt.

Die Reaktionsmischung wurde mit Schwefelsäure auf 1/1-normal angesäuert und 20 Stdn. mit Äther extrahiert. Nach Zusatz von wenig Wasser wurde der Äther verdampft. Der Rückstand enthielt 0,25 mMole Milchsäure (bestimmt mit 2,7-Dioxynaphthalin nach FEIGL (Spot Tests). 0,5 cm³ der zu prüfenden Lösung + 2 mg Dioxynaphthalin, gelöst in 2 cm³ konz. H_2SO_4, 5 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Milchsäure gibt eine rote Färbung).

Die extrahierte Milchsäure wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und dann der aufsteigenden Papierchromatographie in Äthanol-Wasser-Ammoniak unterworfen (80 Vol. Äthanol, 16 Vol. Wasser, 4 Vol. konz. Ammoniak). Das Gebiet um R_f = 0,5 wurde eluiert, die Milchsäure wurde aus dem mit Schwefelsäure angesäuerten Eluat 15 Stdn. ausgeäthert. Die extrahierte Säure wurde mit Zinkcarbonat bei 65⁰ in das Zinksalz übergeführt, das im Vakuum über Blaugel ge-

trocknet wurde. Die Bestimmung der Drehung ergab: 9,2 mg Zinksalz pro cm^3. Im 1-dcm-Rohr $\alpha_D = +0{,}120^0$, also $(\alpha)_D = +13^0$, während in der Literatur für die Drehung des D-milchsauren Zinks $+10^0$ bis $+12^0$ angegeben wird.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. im Hochvakuum bei 60^0 getrocknet. Wir fanden:

3,432 mg. 3,740 mg CO_2. 1,271 mg H_2O.
1,132 mg Rückstand (ZnO).
3,513 mg. 3,894 mg CO_2. 1,361 mg H_2O.
1,151 mg Rückstand (ZnO).

Für $(C_3H_5O_3)_2Zn$

Gef. C 29,7; 30,25 H 4,16; 4,35 Zn 26,50; 26,30.
Ber. C 29,55 H 4,11 Zn 26,85.

Es lag also fast reines D-milchsaures Zink vor.

2. L-(+)-*Milchsäure aus Brenztraubensäure mit Milchsäuredehydrase aus Muskeln.* Das gleiche Präparat des hydrierten Pyridinnucleotids von Böhringer wurde verwendet, wie in Versuch 1. Die Milchsäuredehydrase von Böhringer war kristallisiert und aus Muskeln hergestellt.

Zu 50 cm^3 *m*/20-Natriumpyrophosphat pH 8,2 wurden 0,25 mMole brenztraubensaures Natrium und 0,26 mMole Natriumsalz des Dihydro-diphosphopyridin-nucleotids gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Milchsäuredehydrase in Gang gesetzt. Ergab die optische Prüfung, daß der größte Teil des Pyridinnucleotids reagiert hatte, so wurde mit Schwefelsäure auf 1/1-normal angesäuert, 20 Stdn. mit Äther extrahiert, der Äther unter Zusatz von wenig Wasser verdampft und die wäßrige Lösung mit Zinkcarbonat auf 65^0 erwärmt. Die spezifische Drehung des trockenen Zinksalzes betrug $[\alpha]_D = -9{,}25^0$, $[\alpha]_D = -10^0$ bis -12^0 werden für das L-milchsaure Zink angegeben.

Es lag also L-Milchsäure vor, während in Versuch 1 mit dem gleichen Pyridinnucleotid-Präparat D-Milchsäure gebildet worden war.

3. D-*Milchsäure aus Chlorella nach Anaerobiose.* 75 000 mm^3 *Chlorella* wurden in einer Salzlösung gewaschen und suspendiert, die 0,5% $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ und 0,25% KH_2PO_4 enthielt und mit Schwefelsäure auf pH 3,8 angesäuert war. In einem Volumen von 250 cm^3 wurden die Zellen 5 Stdn. anaerob geschüttelt. Dann wurde 5 Min. auf 70^0 erhitzt, wobei die Milchsäure in die überstehende Flüssigkeit austrat. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure bis 1/1-normal angesäuert und 20 Stdn. ausgeäthert. Nach Zusatz von wenig Wasser wurde der Äther verjagt. Die stark saure wäßrige Lösung wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht, auf Papier aufgetragen und mit Äthanol-Wasser-Ammoniak (80 Vol.:16 Vol.:4 Vol.) zum Aufsteigen gebracht. Der Bezirk um $R_f = 0{,}5$ wurde eluiert, nach Ansäuern mit Schwefelsäure ausgeäthert und mit Zinkcarbonat in das Zinksalz übergeführt. Ausbeute 63 mg.

Das Zinksalz war noch nicht rein, es enthielt zuviel Kohlenstoff, zu wenig Zink und die Rechtsdrehung war zu stark. Es wurde deshalb nochmals wie oben der Papierchromatographie unterworfen. Dann wurde nochmals ausgeäthert und das Zinksalz hergestellt. Die Bestimmung der Drehung des trockenen Salzes, Zinksalzes, ergab:

6,75 mg pro cm^3. Im 1-dcm-Rohr $\alpha_D = +0{,}075^0$,
also $[\alpha]_D = +11{,}1^0$,
12,85 mg pro cm^3. Im 1-dcm-Rohr $\alpha_D = +0{,}125^0$,
also $[\alpha]_D = +9{,}8^0$.

während $[\alpha]_D = +10^0$ bis $+12^0$ für das D-milchsaure Zink angegeben werden.

L-*Äpfelsäure aus Oxalessigsäure mit Chlorella-Extrakt.* Oxalessigsäure ist diejenige Ketonsäure, die nach unsern Erfahrungen in *Chlorella*-Extrakten durch hydriertes Pyridinnucleotid am schnellsten hydriert wird. Brenztraubensäure wird etwa 20mal langsamer hydriert, α-Ketoglutarsäure wird nicht hydriert. Es war von Interesse zu prüfen, ob die bei der Hydrierung der Oxalessigsäure gebildete Äpfelsäure D- oder L-Äpfelsäure ist.

Wir haben die gebildete Äpfelsäure nicht isoliert, sondern nur die Größe und Richtung ihrer Drehung bestimmt und davon Gebrauch gemacht, daß bei Zusatz von Molybdänsäure die Äpfelsäure die sehr hohe spezifische Drehung von etwa 1500^0 aufweist. Die Drehung des Pyridinnucleotids wird durch Molybdänsäure nicht gesteigert, so daß dessen Drehung ($[\alpha]_D \approx -30^0$) die Bestimmung der Äpfelsäure nicht stört.

Zur Hydrierung der Oxalessigsäure wurden zu 3 cm^3 $m/20$-Natriumpyrophosphat pH 6,2 9,5 μMole neutralisierte Oxalessigsäure gegeben und ebensoviel μMole Natriumsalz des Dihydrodiphospho-pyridin-nucleotids (Böhringer). Die Reaktion wurde durch 0,1 cm^3 *Chlorella*-Extrakt in Gang gesetzt und war nach 30 Min. bei 20^0, wie die optische Prüfung zeigte, zu Ende.

Zu 4 cm^3 unserer Reaktionslösung gaben wir nach der Vorschrift von Krebs und Eggleston[3] 1 cm^3 26proz. Na_3-Citrat, 0,5 cm^3 Eisessig und 4,5 cm^3 29proz. Ammoniummolybdat, schüttelten mit 0,25 g Carbo medicinalis zur Klärung und bestimmten in dem Filtrat die Drehung der Lösung. Wir fanden:

0,107 mg Äpfelsäure pro cm^3.

Im 1-dcm-Rohr $\alpha_D = +\ 0{,}152^0$, also $[\alpha]_D = +\ 1420^0$. Mit reiner L-Äpfelsäure fanden wir unter sonst gleichen Bedingungen:

0,4 mg Äpfelsäure pro cm^3.

Im 1-dcm-Rohr $\alpha_D = +\ 0{,}635^0$, also $[\alpha]_D = +\ 1585^0$.

Die bei der Hydrierung der Oxalessigsäure gebildete Äpfelsäure war also reine L-Äpfelsäure.

Literatur

1 Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Z. 286 (1936), 81.
2 Kubowitz, F., und Ott, P., Biochem. Z. 314 (1943), 94.
3 Krebs, H. A., und Eggleson, Biochem. J. 39 (1945), 408.

49 Sauerstoff-Halbwertdrucke der Photosynthese und Atmung*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Bestimmung der Sauerstoff-Halbwertdrucke der Photosynthese und Atmung mit dem Ergebnis, daß die Halbwertdrucke der beiden Vorgänge sehr nahe übereinstimmen.

Seit man weiß[1], daß bei der Photosynthese die Kohlensäure durch die Energie der Atmung in den Photolyten umgewandelt wird, versteht man, warum Sauerstoff für die Photosynthese notwendig ist, wie es seit Boussingault[2] von vielen Pflanzenphysiologen angenommen wurde, aber — vor der Zeit der *Chlorella* und der Manometrie — nie einwandfrei bewiesen werden konnte. Die ersten, die die neuen

Abb. 1. Manometriegefäß zur Messung niedriger O_2-Drucke.

Methoden zur Entscheidung des Sauerstoff-Problems sachgemäß anwandten, waren Hill und Wittingham[3]. Die folgenden manometrischen Versuche mit *Chlorella* beantworten die Frage des Sauerstoffbedarfs der Photosynthese in der einfachsten Weise und endgültig.

In Manometriegefäße von der Form der Abb. 1 werden 100 mm^3 *Chlorella* gegeben, suspendiert in einer Bicarbonat-Carbonatlösung von pH 8,8, die mit 2 Vol.-% Kohlensäure im Gleichgewicht ist und während Atmung und Photosynthese den CO_2-Druck konstant hält; so daß alle Druckänderungen, die auftreten, nur Änderungen des O_2-Drucks sein können[4].

Um in den Gefäßen, in die die Zellen eingefüllt sind, die gewünschten O_2-Drucke herzustellen, benutzen wir die Zellen selbst und lassen sie im Dunkeln O_2

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 66.

verbrauchen, wenn wir den O_2-Druck vermindern wollen; oder im Hellen O_2 entwickeln, wenn wir den O_2-Druck erhöhen wollen. Wir beginnen, indem wir den Gasraum mit 2 Vol.-% CO_2-Argon füllen und lassen zunächst im Dunkeln 60 Minuten atmen, bis O_2-Reste fast verbraucht sind und die Atmung fast Null geworden ist. Belichten wir dann, so wächst der Sauerstoffdruck allmählich autokatalytisch an und mit ihm die Photosynthese, bis die Photosynthese einen konstanten Endwert erreicht hat, der durch Zunahme des O_2-Drucks nicht mehr gesteigert werden kann. Dann sind die Zellen mit O_2 „gesättigt", der „Sättigungswert der Photosynthese" ist erreicht. Verdunkeln wir wieder, so nimmt infolge

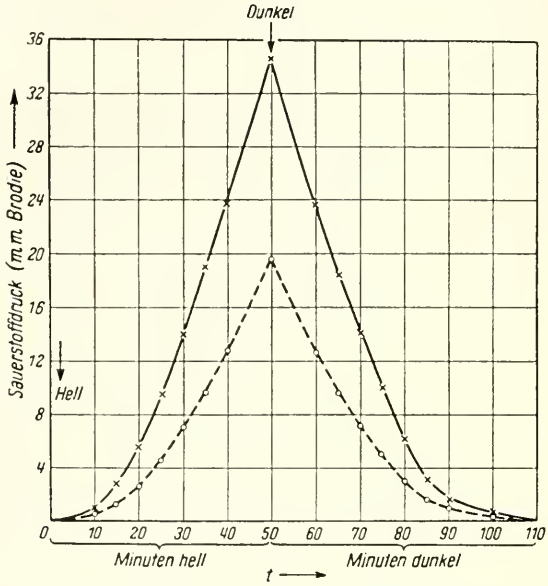


Abb. 2. Sauerstoffentwicklung im Licht und Sauerstoffverbrauch im Dunkeln als Funktion des Sauerstoffdrucks. Je 100 mm³ Zellen, suspendiert in 7 cm³ $m/5$-Bicarbonat-Carbonat, 95 Bicarbonat, 5 Carbonat. Gasraum 2 Vol.-% CO_2-Argon. 20°. Obere Kurve Gefäßvolumen 16,759 cm³. k_{O_2} = 0,931. Untere Kurve Gefäßvolumen 21,544 . k_{O_2} = 1,377. Eingestrahltes Licht: 30 mm³ Quanten grünes Licht pro Minute.

der Atmung der O_2-Druck wieder bis fast auf den Wert Null ab. Die beiden Kurven der Abb. 2, die mit Gefäßen verschiedener Größe erhalten wurden, veranschaulichen, wie sich mit dem O_2-Druck Photosynthese und Atmung ändern.

Legt man bei verschiedenen O_2-Drucken p Tangenten an die Kurven an, so ergeben die Tangenten an die aufsteigende Kurve die Photosynthese $+ dp/dt$ und die Tangenten an die absteigende Kurve die Atmung $-dp/dt$, für die am Ort der Tangenten herrschenden O_2-Drucke. Ohne die Manometriegefäße zu öffnen, kann man den Versuch durch abwechselndes Belichten und Verdunkeln beliebig oft wiederholen und so die Abhängigkeit der Photosynthese vom O_2-Druck mit großer Genauigkeit bestimmen.

Das Ergebnis ist, daß die Photosynthese unterhalb eines O_2-Drucks von 1 mm Wasser sehr klein ist; daß sie bei 3 mm O_2-Druck den halben Wert ihres Sättigungs-

wertes erreicht hat und daß sie bei 25 mm Wasser ihren Sättigungswert erreicht hat; ferner, daß die Atmung fast genau die gleiche Abhängigkeit vom O_2-Druck zeigt, wie die Photosynthese. Offenbar ist die Hemmung der Atmung die Ursache der Hemmung der Photosynthese. Abb. 3 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

Wie wir früher gezeigt haben[5], ist der O_2-Halbwertdruck der Atmung um so kleiner, je kleiner die Zellen sind und wahrscheinlich auch, je kleiner ihr O_2-Verbrauch ist. Das gleiche muß auch für den O_2-Halbwertdruck der Photosynthese gelten. Jedenfalls hat sich *Chlorella*, mit ihrem hohen Halbwertdruck, wiederum als ein besonders günstiges Versuchsobjekt erwiesen. Denn je höher der Halbwertdruck, um so leichter ist es aus methodischen Gründen, die Notwendigkeit des O_2 für die Photosynthese nachzuweisen und durch Druckmessungen zu erfassen.

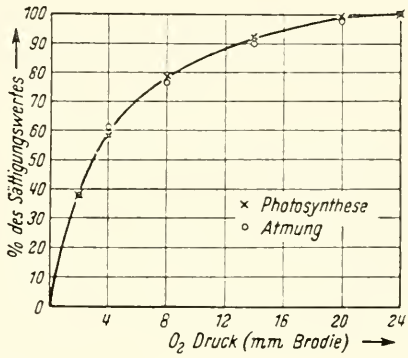


Abb. 3. Atmung und Photosynthese bei niedrigen Sauerstoffdrucken.

Erläuterungen

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Versuchsanordnung ist die Lichtintensität, mit der man während des autokatalytischen Anstiegs der Photosynthese bestrahlt. Wenn man schwach bestrahlt, so daß die Atmung bei Sättigung mit O_2 nur gerade kompensiert ist, so kann der O_2-Druck nicht steigen, es kann also auch die Photosynthese nicht steigen, es gibt keine Autokatalyse, und wenn bei sehr niedrigen O_2-Drucken die Photosynthese Null ist, so bleibt sie Null, solange man auch belichten mag. Belichtet man andererseits zu stark, so wird die Zeit des autokatalytischen Anstiegs der Photosynthese zu sehr zusammengedrängt und man erhält den Sättigungswert der Photosynthese so schnell, daß man die Wirkung des niedrigen O_2-Drucks übersehen kann. Die richtige Licht-Intensität liegt in der Mitte und soll etwa so groß sein, daß die Atmung 1mal überkompensiert wird, wie es in dem Versuch der Abb. 2 der Fall ist. Dann ist die Zeit des autokatalytischen Anstiegs im Licht auf etwa eine halbe Stunde hinausgezogen und der Anstieg der Photosynthese mit dem O_2-Druck kann sehr genau gemessen werden.

Daß in der Zeit der Autokatalyse die Zunahme der Photosynthese wirklich alleine von der Zunahme des O_2-Drucks herrührt, wurde bewiesen, indem in zwei Gefäßen von ungleichem Volumen gleiche Zellmengen unter identischen Bedingungen bestrahlt wurden. Auf diese Weise wurden die beiden Kurven der Abb. 2 erhalten, die höhere für das kleine Gefäß und die niedrigere für das größere Gefäß. Man

überzeuge sich durch Anlegen der Tangenten an Kurvenpunkte gleichen O_2-Drucks, daß die Photosynthese auf beiden Kurven für gleiche p-Werte gleich war:

$$dp'/dt \cdot k_{O_2}' = dp/dt \cdot k_{O_2},$$

wo sich die gestrichenen Größen auf das eine Gefäß und die ungestrichenen Größen auf das andere Gefäß beziehen. Ungleich jedoch waren die Zeiten, in denen die Punkte gleichen Druckes und gleicher Photosynthese auf beiden Kurven erreicht wurden, weil bei gleichem chemischem Umsatz der O_2-Druck in dem kleinen Gefäß schneller steigt als in dem großen Gefäß.

Anmerkung. Da Photosynthese = O_2-Entwicklung im Licht + O_2-Verbrauch der Atmung ist, so war — bei einfacher Überkompensation der Atmung — der korrekte Wert der Photosynthese

$$2 \cdot dp/dt \cdot k_{O_2}.$$

Da sich aber der Faktor 2 überall heraushebt, wurde er fortgelassen.

Milchsäure

Wenn in *Chlorella* durch anaerobe Milchsäurebildung die Reaktion saurer wird, so zerfällt die Glutaminsäure; und da die Glutaminsäure[6] für die Photosynthese notwendig ist, so kann bei anaerobiotischen Versuchen Glutaminsäurezerfall und O_2-Mangel bei der Hemmung der Photosynthese zusammenwirken. Bei vielen älteren Versuchen ist das tatsächlich der Fall gewesen.

Bei unseren Versuchen waren Milchsäurebildung und Glutaminsäurezerfall ohne Bedeutung, da wir Südfenster-Zellen benutzten, die während unserer Versuchszeiten so wenig Milchsäure bilden, daß fast keine Glutaminsäure zerfällt.

Literatur

1 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12.
2 Boussingault, J. B., C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 16 (1865), 608.
3 Hill, R., und Wittingham, C. P., New Phytologist 52 (1953), 133, weitere Literatur bei Warburg, O., Z. angew. Chem. 69 (1957), 627.
4 Warburg, O., Geleick, H., und Briese, K., Z. Naturforschg. 6b (1951), 285.
5 Warburg, O., und Kubowitz, F., Biochem. Z. 214 (1929), 5.
6 Warburg, O., Klotzsch, W., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 622; 13b (1958), 63.

50 Carotinoid-Oxygenase in *Chlorella**

Von Otto Warburg, Günther Krippahl, Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

In *Chlorella* wurde ein bisher unbekanntes labiles Oxygenasesystem gefunden, das im Dunkeln mit großer Geschwindigkeit Sauerstoff auf Carotinoide überträgt und das durch Licht gehemmt wird. Vgl. dazu O. Warburg, G. Krippahl und W. Schröder, Wirkungsspektrum eines Photosynthese-Ferments, diese Z. 10b, 631 [1955].

Bei der Fortsetzung unserer Versuche über die Chemie der Photosynthese haben wir in *Chlorella* ein Fermentsystem gefunden, das ähnlich labil ist wie das Glutaminsäuresystem[1]; dessen Umsatz wesentlich größer ist; und das sich dadurch auszeichnet, daß es lichtempfindlich ist.

Gibt man zu lebender *Chlorella* wenig Octanol oder Chinon, so verschwindet die Atmung und es erscheint ein großer O_2-Verbrauch, der ohne Entwicklung von Kohlensäure beendet ist, wenn 100 mm^3 *Chlorella* 150 bis 200 mm^3 O_2 aufgenommen haben. Bei 20^0 C und pH 6,5 beträgt die Halbwertszeit des O_2-Verbrauchs etwa 20 Minuten, die maximale Geschwindigkeit etwa 500 mm^3 O_2 pro Stunde, das ist die 5fache Geschwindigkeit des O_2-Verbrauchs der Atmung. — Die gleiche Reaktion findet man, wenn man *Chlorella* in gefrorenem Zustand trocknet, das Trockenpulver in Phosphatlösung suspendiert und bei 20^0 mit Luft schüttelt. — Die Reaktion wird durch kurzes Erwärmen auf 65^0 zum Verschwinden gebracht, ist also eine Fermentreaktion. Die Reaktion wird nicht gefunden in den gewaschenen grünen Grana. Die Reaktion wird weder durch 10^{-3}-*n*. Phenanthrolin noch durch 10^{-3}-*n*. Blausäure gehemmt. Sie ist, anders als die Atmung, erheblich abhängig vom O_2-Druck.

Die Oxygenase ist nicht die Glykolsäure-Oxygenase, die Tolbert[2] in den Säften höherer Pflanzen gefunden hat. Denn weder vermehrt zugesetzte Glykolsäure den Sauerstoffverbrauch noch ist unter den Reaktionsprodukten Glyoxylsäure oder Oxalsäure oder Kohlensäure nachweisbar. Dagegen haben wir gefunden, daß im Verlauf der Reaktion die Carotinoide abnehmen, auf $^1/_{10}$, wenn die Reaktion durch Octanol oder auf die Hälfte, wenn sie durch Chinon hervorgerufen wird. Es liegt also eine fermentative Oxydation der Carotinoide durch molekularen O_2 vor, und diese Oxygenasereaktion wird dadurch noch interessanter, daß sie lichtempfindlich ist. Im Licht wird weniger O_2 verbraucht als im Dunkeln, und entsprechend nehmen die Carotinoide im Licht weniger ab. Die einfachste Erklärung dafür ist, daß das Ferment, das den O_2 aufnimmt, im Licht O_2 abspaltet. Da auch rotes Licht herbei wirksam ist, so ist auch Chlorophyll an der Lichtreaktion beteiligt, das selbst bei der Reaktion abnimmt, aber viel weniger, als die Carotinoide.

Methoden

Als Versuchsmaterial wurden 2tägige Südzellen benuzt. Sie wurden in den Salzlösungen „K" oder „S" suspendiert:

Salzlösung K: 5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 2 g NaCl + 2 g KNO_3 + 0,5 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ + 1 *l* Wasser.

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 437.

Salzlösung S: Nitrat ersetzt durch 0,2 g NH_4Cl.
Salzlösung S+: 5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 1 *l* Wasser.

Für alle manometrischen Versuche wurden die neuen Wannengefäße[3] benutzt, wegen der schnelleren Absorption der CO_2 durch Kalilauge. — Das Chinon war mehrfach aus Petroläther umkristallisiert worden. — Die Carotinoide wurden optisch nach *Willstaetter* bestimmt, nach Abtrennung der Chlorophylle durch Verseifung.

Zur Gewinnung der Trockenzellen wurde die *Chlorella* scharf zentrifugiert, in sehr wenig Wasser aufgenommen und in 2 mm hoher Schicht auf dem Boden einer Schale ausgebreitet. Dann wurde mit Trockeneis gefroren und 4 Stdn. im Vakuum getrocknet. Werden die Trockenzellen bei — 20° aufbewahrt, so nimmt ihre Wirksamkeit nur langsam ab.

Bei allen manometrischen Versuchen mit Trockenzellen wurden die Trockenzellen in die Ansatzbirne eines Manometriegefäßes gebracht und erst bei t_0 in den Hauptraum gegeben, wobei der O_2-Verbrauch sofort beginnt. Würde man die Trockenzellen schon vor Beginn der manometrischen Messung in Salzlösung suspendieren, so würde der größere Teil der Oxydationsreaktion der Beobachtung entgehen.

Aktiviert man die Oxygenase mit Chinon, und hat man bei der Manometrie Kalilauge im Einsatz, so destilliert Chinon aus dem Hauptraum in die Kalilauge und erzeugt hier — wegen der Oxydation zu Tetraoxychinon — einen O_2-Verbrauch. Um diesen (geringen) O_2-Verbrauch zu eliminieren, wird immer eine Kontrolle ohne Zellen eingehängt, deren Druckänderungen von den Versuchs-Druckänderungen abzuziehen sind. — Hat man *keine* Kalilauge im Einsatz, so wird Kohlensäure aus Glutaminsäure in den Gasraum entwickelt, da Chinon auch die Glutaminsäuredecarboxylase aktiviert. Man findet dann den anfänglichen O_2-Verbrauch der Oxygenasereaktion zu klein. — Will man bei der Aktivierung durch Chinon die Wirkung des Lichts auf die Oxygenase-Reaktion untersuchen, so muß vorher das zugesetzte Chinon durch kurze starke Belichtung vollständig reduziert werden, andernfalls würde die O_2-Entwicklung aus Chinon die Wirkung des Lichts auf die Oxygenasereaktion überlagern. — Bei der Aktivierung durch Chinon sind also gewisse Fehlermöglichkeiten vorhanden, die bei der Aktivierung durch Gefriertrocknung nicht vorhanden sind.

I. Versuche mit frischer (nicht getrockneter) Chlorella

In Abb. 1 ist ein Versuch graphisch dargestellt, bei dem *Chlorella* mit verschiedenen Mengen Chinon aktiviert wurde. Wie man sieht, hängt die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme von der Chinonmenge ab, aber die Endwerte an verbrauchtem O_2 sind in beiden Fällen fast gleich.

Abb. 2 zeigt den Einfluß von pH. Die Geschwindigkeit ist am größten bei pH 6,5. Bei pH 3,8 und pH 5,3 ist die Induktionsperiode hinausgezogen.

Abb. 3 zeigt den Einfluß des O_2-Drucks. In 10 Vol.-% O_2 ist die Geschwindigkeit deutlich kleiner als in Luft, in 1 Vol.-% O_2 ist die Geschwindigkeit der Oxydation sehr viel kleiner als in Luft.

Abb. 4 zeigt das Verhalten der Carotinoide bei der Oxygenasereaktion. Eine *Chlorella*-Suspension wurde in 3 gleiche Teile geteilt. Teil I diente als Kontrolle und wurde ohne Chinonzusatz 225 Minuten dunkel mit Luft geschüttelt. Teil III wurde *mit* Chinon 225 Minuten dunkel in Luft geschüttelt. Teil II wurde 225

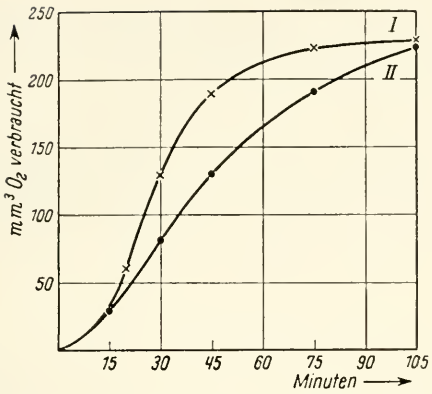


Abb. 1. 20°. Hauptraum 100 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ K-Lösung pH 4,2. Gasraum Luft. Einsatz Kalilauge. In den Birnen 0,2 oder 2,0 mg Chinon, gelöst in 0,2 cm³ Wasser. Bei t_0 Chinon in den Hauptraum gegeben. Kurve I: 2 mg Chinon. Kurve II: 0,2 mg Chinon.

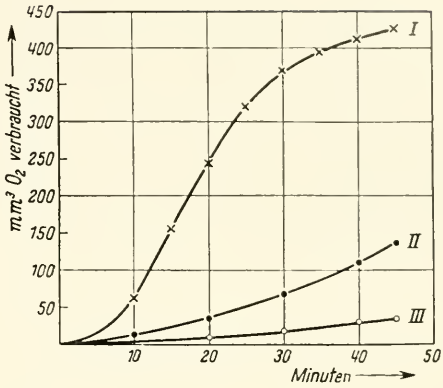


Abb. 2. 20°. Hauptraum 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in K-Lösung von verschiedenem pH-Wert. Gasraum Luft. Einsatz KOH. In den Birnen 2 mg Chinon in 0,2 cm³ Wasser. Bei t_0 Chinon in den Hauptraum gegeben. Kurve I: pH 6,5; Kurve II: pH 3,8; Kurve III: pH 5,3.

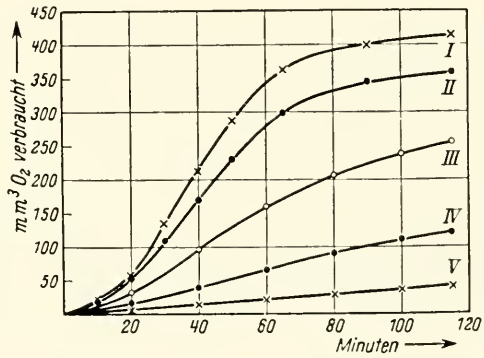


Abb. 3. 20°. Hauptraum 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in Salzlösung S+, pH 4,5. Im Einsatz Kalilauge. In den Birnen je 2 mg Chinon in 0,2 cm³ Wasser. Im Gasraum variierte O_2-Drucke. Bei t_0 Chinon in den Hauptraum gegeben. Kurve I: Luft. Kurve II: 10 Vol.-% O_2 in Argon, Kurve III: 5 Vol.-% O_2 in Argon, Kurve IV: 2 Vol.-% O_2 in Argon, Kurve V: 1 Vol.-% O_2 in Argon.

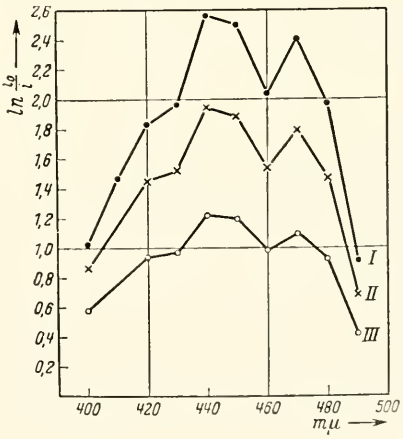


Abb. 4. 20°. Hauptraum 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in S, pH 3,8. In den Birnen *kein* Chinon oder *2 mg* Chinon, im Gasraum Luft. Kurve I: Kontrolle ohne Chinon. Normale Atmung. Kurve II: 2 mg Chinon, hell (730 mm³ Quanten weißes Licht pro Min. eingestrahlt). In der Oxygenasereaktion nach 225 Min. 60 mm³ O_2 verbraucht. Kurve III: 2 mg Chinon, dunkel. In den 225 Min. 370 mm³ O_2 verbraucht.

Minuten *mit* Chinon *unter Belichtung* in Luft geschüttelt. Dann wurde mit Wasser gewaschen, zentrifugiert und mit Methanol extrahiert. Aus den Methanolextrakten wurde das Chlorophyll nach WILLSTAETTER durch Verseifung entfernt, die im Äther bleibenden Carotinoide wurden mit Äthanol auf 100 cm^3 aufgefüllt. Dann wurde zwischen 400 und 500 mμ die Lichtschwächung für 1 cm Schichtdicke bestimmt, die Logarithmen sind in Abb. 4 als Ordinaten aufgetragen. Wie man sieht, bewirkt die Aktivierung der Oxygenasereaktion, daß die Carotinoide im Dunkeln auf die Hälfte, im Licht aber nur auf $^3/_4$ des Normalwerts abnehmen.

II. Versuche mit Trocken-Chlorella

Abb. 5 zeigt das Verhalten von Trockenzellen im Dunkeln und bei Belichtung mit 2 verschiedenen Lichtstärken. Eingesetzt werden je 25 mg Trockenzellen, ent-

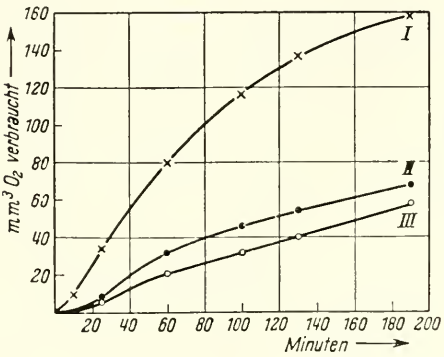


Abb. 5. 20°. Im Hauptraum 3 cm^3 $m/50$-Phosphat 0,1% KCl. pH 6,5. In den Birnen 25 mg Trocken-*Chlorella*. Im Gasraum Luft. Im Einsatz KOH. Bei t_0 wurden die Trockenzellen in den Hauptraum gegeben. Kurve I: Dunkel. Kurve II: Weißes Licht. 200 mm^3 Quanten pro Min. eingestrahlt. Kurve III: Weißes Licht. 750 mm^3 Quanten pro Min. eingestrahlt.

sprechend 100 mm^3 frischer *Chlorella*. Wie man sieht, werden im Dunkeln etwa 160 mm^3 = 7,2 μMole O_2 als Endwert verbraucht. Viel weniger O_2 wird im Licht verbraucht, um so weniger, je stärker belichtet wird.

Der Versuch sieht ähnlich aus, wie die Kompensierung der Atmung in lebender *Chlorella* durch Photosynthese. Man beachte jedoch, daß Trockenzellen keine Atmungskohlensäure entwickeln und daß Trockenzellen aus Kohlensäure keinen O_2 entwickeln.

Literatur

1 WARBURG, O., KLOTZSCH, H., und KRIPPAHL, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 622.
2 TOLBERT, N. E., und Mitarbb., J. biol. Chemistry 178 (1949), 977; 181 (1949), 905; 186 (1950), 791; 204 (1955), 639.
3 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

51 Hill-Reaktionen*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Die Lichtreaktion der *Hill*-Reaktion ist nicht die Spaltung des Wassers, sondern die Spaltung der Kohlensäure. Die Sauerstoffatmung, deren Energie bei der normalen Photosynthese die Spaltung der CO_2 ermöglicht, ist bei den *Hill*-Reaktionen durch „sauerstofflose" Atmungsvorgänge ersetzt, bei denen Ferrisalze oder Chinon oder chinoide Farbstoffe den molekularen Sauerstoff ersetzen. Die Theorie der primären Wasserzersetzung, auf der die heutigen chemischen Theorien der Photosynthese beruhen, kann hiernach nicht länger aufrechterhalten werden.

Suspendiert man *Chlorella* in CO_2-freier Salpetersäure und belichtet, so wird stundenlang Sauerstoff entwickelt nach der Gleichung:

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2,$$

eine Reaktion, die wir 1920 gefunden und dahin aufgeklärt haben[1], daß die Salpetersäure zunächst Kohlenstoff in einer Dunkelreaktion zu Kohlensäure oxydiert und daß dann im Licht die Kohlensäure in $C + O_2$ gespalten wird:

$$\begin{array}{lll} \text{Dunkel:} & HNO_3 + 2\,C + H_2O = NH_3 + 2\,CO_2, & [1a] \\ \text{Hell:} & 2\,CO_2 = 2\,C + 2\,O_2, & [1b] \\ \hline \text{Bilanz:} & HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2. & [1] \end{array}$$

Es lag nahe, die von Hill[2] 1939 entdeckte Wirkung der Eisensalze auf belichtete Chloroplasten in ähnlicher Weise durch die Annahme zu erklären, daß die Eisensalze zunächst Kohlenstoff in einer Dunkelreaktion zu Kohlensäure oxydieren und daß dann im Licht die Kohlensäure in $C + O_2$ gespalten wird:

Diese Erklärung wurde 1955 für *Chlorella* bewiesen, als wir fanden[3], daß Ferricyanid, wenn es zu lebender *Chlorella* gegeben wird, zunächst Kohlenstoff in einer Dunkelreaktion (die in lebender *Chlorella* mehr als 24 Stunden andauert) zu Kohlensäure oxydiert und daß dann im Licht die Kohlensäure in $C + O_2$ gespalten wird:

$$\begin{array}{ll} \text{Dunkel:} & 4\,\text{Ferri} + C + 2\,H_2O = 4\,\text{Ferro} + 4\,H^{\oplus} + CO_2, \\ \text{Hell:} & CO_2 = C + O_2, \\ \hline \text{Bilanz:} & 4\,\text{Ferri} + 2\,H_2O = 4\,\text{Ferro} + 4\,H^{\oplus} + O_2. \end{array}$$

Würde man hier das Ferricyanid durch Chinon[4] ersetzen, so wären die entsprechenden Gleichungen:

$$\begin{array}{ll} & 2\,\text{Chinon} + 2\,H_2O + C = 2\,\text{Hydrochinon} + CO_2, \\ & CO_2 = C + O_2, \\ \hline \text{Bilanz:} & 2\,\text{Chinon} + 2\,H_2O = 2\,\text{Hydrochinon} + O_2. \end{array}$$

Hier aber tritt die Schwierigkeit auf, daß Chinon die Reaktion $CO_2 = C + O_2$ in *Chlorella* zu hemmen scheint, da bei Zusatz von Chinon + Kohlensäure die Sauerstoffentwicklung im Licht halt macht, nicht wenn die Kohlensäure, sondern wenn das Chinon verbraucht ist. So war es bisher unmöglich anzunehmen, daß bei der Chinonreaktion in *Chlorella* die Reaktion $CO_2 = C + O_2$ eine Zwischenreaktion ist, und es blieb nichts anderes übrig, als sich mit zwei Arten[5] von Hill-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 509.

Reaktionen abzufinden, solchen, deren Lichtreaktion die Reaktion $CO_2 = C + O_2$ ist, und solchen, deren Lichtreaktion eine unbekannte Reaktion ist — ein unbefriedigendes, wenig wahrscheinliches Ergebnis.

Im folgenden wird gezeigt, daß dieser Dualismus nicht existiert, sondern daß den HILL-Reaktionen ein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt. Wir haben gefunden, daß für die Chinonreaktionen Kohlensäure notwendig ist, zwar wenig, aber doch soviel, daß man den notwendigen Druck der Kohlensäure gut messen kann. Die Notwendigkeit der Kohlensäure aber bedeutet, daß auch bei den Chinonreaktionen die Kohlensäure ein Zwischenprodukt ist, so wie es die obigen Gleichungen zum Ausdruck bringen.

Es ist dabei kein Widerspruch, daß bei gleichzeitigem Zusatz von Chinon und von Kohlensäure in der Bilanz keine Kohlensäure, sondern nur Chinon verbraucht wird. Chinon hemmt die Sauerstoffatmung und nur, weil eine „Chinonatmung" an Stelle der Sauerstoffatmung tritt, ist bei Gegenwart von Chinon eine Spaltung der Kohlensäure durch Licht energetisch möglich. Erzeugt, wie es die folgenden Gleichungen veranschaulichen, die Chinonatmung immer ebensoviel Kohlensäure, als Kohlensäure im Licht verschwindet, so hebt sich der Kohlensäureumsatz aus der Bilanz heraus. Die Spaltung der Kohlensäure im Licht aber muß aufhören, wenn alles Chinon veratmet worden ist, da dann keine Energie mehr zur Verfügung steht, um die Kohlensäure in den Photolyten C^*O_2 umzuwandeln. Die folgenden Gleichungen bringen dies zum Ausdruck und erklären erstens, warum die Kohlensäure aus der Bilanz verschwindet und zweitens, warum in der Bilanz die Sauerstoffentwicklung dem Chinonverbrauch äquivalent ist.

$$\begin{aligned}
2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O + C &= 2\ \text{Hydrochinon} + CO_2 \\
&\qquad\qquad\qquad\qquad + 60\,000\ \text{cal.}, \\
CO_2 &= C^*O_2 \qquad - 60\,000\ \text{cal.}, \\
C^*O_2 &= C + O_2, \\
\hline
\text{Bilanz:}\quad 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O &= 2\ \text{Hydrochinon} + O_2.
\end{aligned}$$

Zu unseren Schlußfolgerungen stimmen Versuche mit einem anderen HILL-Reagens, dem Ferricyanid, das gegenüber dem Chinon den Vorzug hat, daß es die Sauerstoffatmung der *Chlorella nicht* hemmt. Gibt man zu *Chlorella* sowohl Ferricyanid als auch Kohlensäure und belichtet, so ist der Endwert an entwickeltem Sauerstoff der Summe von Ferricyanid + Kohlensäure äquivalent, da sowohl die Sauerstoffatmung als auch die Eisenatmung Energie zur Bildung des Photolyten liefern. Sind aber die Versuchsobjekte nicht *Chlorella*, sondern grüne Grana (die nicht atmen), so ist der Endwert des entwickelten Sauerstoffs nur dem Ferricyanid äquivalent, soviel Kohlensäure der Gasraum enthalten mag. Nicht das HILL-Reagens, sondern die Sauerstoffatmung entscheidet darüber, ob in der Bilanz einer Lichtreaktion Kohlensäure verschwindet oder nicht.

Der Schlüssel zum Verständnis der HILL-Reaktionen ist also die Atmung, und zwar nicht die Ruheatmung, sondern die induzierte Atmung. HILL-Reagenzien ersetzen nicht die Kohlensäure, sondern sie ersetzen den molekularen Sauerstoff. HILL-Reaktionen sind nichts anderes als Wieland-Thunbergsche „sauerstofflose" Atmungsvorgänge, deren Energie, wie die Energie der Sauerstoffatmung, die Spaltung der Kohlensäure im Licht hervorrufen können. Was uns die HILL-

Reaktionen lehren, ist nicht Wasserzersetzung im Licht, sondern daß Atmungsvorgänge direkt und unlösbar mit der Spaltung der Kohlensäure verkettet sind — eine neue und unabhängige Bestätigung der Versuche[6] von BURK und WARBURG vom Jahre 1951.

Anm. b. d. Korr.: 1. Wir haben inzwischen gefunden, daß man bei der Chinon-Lichtreaktion in *Chlorella* einen Verbrauch an Kohlensäure *auch in der Bilanz* nachweisen und messen kann, wenn man zu höheren CO_2-Drucken übergeht, z. B. zu einem CO_2-Druck von 1/10 Atmosphäre. Dann geht die induzierte Chinonatmung z. T. nicht mehr bis zur Kohlensäure und man findet im Licht neben der Chinonreduktion und der O_2-Entwicklung auch einen erheblichen Verbrauch an CO_2. Auch dann aber hört die O_2-Entwicklung im Licht sofort auf, wenn die Reduktion des Chinons beendet ist. Denn bei gehemmter O_2-Atmung steht dem Licht nach beendeter Chinonatmung keine Hilfsenergie mehr zur Verfügung.

2. Die intermediäre Bildung und Zersetzung der Kohlensäure, also die katalytische Funktion der Kohlensäure bei den Chinon-Lichtreaktionen, wurde bereits 1946 von uns diskutiert und durch Gleichungen erläutert[7]. 1948 glaubte BOYLE[8] für Spinatgrana dafür den Beweis erbracht zu haben, da er bei Zugabe von Chinon im Licht keine O_2-Entwicklung sah, wenn er bei der Manometrie in den Einsatz Kalilauge gab. CLENDENNING jedoch und HILL konnten die Versuche von BOYLE nicht bestätigen[9].

Nach unseren Erfahrungen sind Spinatgrana das ungünstigste Objekt zur Untersuchung des Einflusses der Kohlensäure, da Spinatgrana besonders reich an Oxalsäure sind, die bei Belichtung mit Chinon Kohlensäure produziert:

$$\text{Chinon} + \text{Oxalsäure} = \text{Hydrochinon} + 2\ \text{Kohlensäure}.$$

Vielleicht hatte BOYLE zufälligerweise besonders oxalsäurearme Spinatgrana in Händen. Auch wußte BOYLE noch nicht, daß bei unserer Manometrie, die BOYLE befolgte, Chinon aus dem Hauptraum in die Kalilauge destilliert und einen O_2-Verbrauch verursacht, der eine *Entwicklung* von O_2 verdecken kann. Es gibt also verschiedene Möglichkeiten, um die widersprechenden Ergebnisse von BOYLE, CLENDENNING und HILL zu erklären. Jedenfalls schien seit CLENDENNING und HILL die Mitwirkung der Kohlensäure bei *Hill*-Reaktionen im negativen Sinn entschieden zu sein.

Allgemeine Vorbemerkungen

Wir unterscheiden im folgenden „Photosynthese" und „HILL-Reaktionen". In beiden ist die Lichtreaktion die Spaltung der Kohlensäure, aber nur bei der Photosynthese nimmt in der Bilanz die Kohlensäure ab. Bei den HILL-Reaktionen bleibt die Kohlensäure in der Bilanz konstant, während die HILL-Reagenzien abnehmen.

Unsere Versuchsobjekte waren lebende *Chlorella* oder Trocken-*Chlorella* oder mit Wasser gewaschene grüne Grana von Spinat, Salat, Kohlrabi oder Mangold. Alle diese Objekte entwickeln im Licht bei Zusatz von Chinon Sauerstoff, aber weder Trockenzellen noch die grünen Grana haben die Fähigkeit zur Photosynthese. Im Fall der Grana ist dies klar, da die gewaschenen Grana keine Sauerstoffatmung haben und also aus CO_2 keinen Sauerstoff entwickeln können. Folgende Eigenschaften unserer verschiedenen Versuchsobjekte sind hervorzuheben:

Mit Wasser gewaschene Grana enthalten keine reaktionsfähige Glutaminsäure. Trocken-*Chlorella* enthält die gesamte Glutaminsäure der *Chlorella*, entwickelt

Zusatz 1961. Wir haben diese Fixierung von Kohlensäure in Chlorella bei der Chinon-Lichtreaktion in späteren Versuchen nicht bestätigen können. Es mag sein, daß dabei die Zeit nach dem Zusatz des Chinons eine Rolle spielt und daß Chlorella nach Zusatz von Chinon im Licht noch solange Kohlenstoff fixieren kann, als die Atmung durch das Chinon noch nicht vollständig zerstört worden ist.

aber nur langsam Kohlensäure aus Glutaminsäure, da das decarboxylierende *Chlorella*-Ferment durch die Trocknung erheblich geschädigt wird. — In *Chlorella* bedarf es nur eines geringfügigen Anstoßes, um die Decarboxylierung der Glutaminsäure hervorzurufen; z. B. genügt eine $3{,}3 \cdot 10^{-4}$-*n*. Chinon-Lösung zur vollständigen Aktivierung. Die doppelte Menge, $6{,}6 \cdot 10^{-4}$-*n*. Chinon, hemmt die Sauerstoffatmung und damit die Photosynthese vollständig irreversibel. Die 10fache Chinonkonzentration gibt im Licht noch eine schnelle HILL-Reaktion. Die HILL-Reaktionen bedürfen also weder der Sauerstoffatmung noch des Glutaminsäuresystems, die aber beide für die Photosynthese notwendig sind. Wie es scheint, hängt das Glutaminsäuresystem mit dem besonderen Mechanismus der induzierten Sauerstoffatmung zusammen, bei dem $^2/_3$ des im Licht gebildeten Kohlenstoffs mit Sauerstoff zurückreagiert.

Auch bezüglich der Carotinoid-Oxygenase[10] verhalten sich unsere 3 Versuchsobjekte verschieden. Die gewaschenen grünen Grana enthalten keine aktive Carotinoid-Oxygenase. In Trocken-*Chlorella* beginnt die Oxygenase sofort zu wirken, wenn man sie in sauerstoffhaltigen Salzlösungen suspendiert, in der Tat so schnell, daß die Suspension der Trockenzellen unter manometrischem Verschluß vorgenommen werden muß, wenn man den Hauptteil des Sauerstoffverbrauchs erfassen will. In lebender *Chlorella* wird die Carotinoid-Oxygenase auf die verschiedenste Art aktiviert, z. B. durch $6{,}6 \cdot 10^{-4}$-*n*. Chinon.

Von den verschiedenen Grana-Arten sind die Spinatgrana zu meiden, weil sie Oxalsäure enthalten und Oxalsäure, ohne Zellen, im Licht mit Chinon Kohlensäure entwickelt, wodurch bei manometrischen Versuchen der CO_2-Druck im Verlauf der Belichtung zunimmt.

Das für die Versuche verwendete Chinon war mehrfach aus Petroläther umkristallisiert. Die wäßrigen Lösungen wurden dunkel gehalten und möglichst sofort verwendet. Als Suspensionsmittel für die *Chlorella* dienten die Salzlösungen K, oder S, oder S*, deren Zusammensetzung mehrfach angegeben worden ist[10].

I. Chinon, dunkel

Gibt man Chinon unter anaeroben Bedingungen zu *Chlorella*, so werden in kurzer Zeit erhebliche Mengen von Kohlensäure entwickelt, die zum größeren Teil aus der Decarboxylierung der Glutaminsäure, z. T. aus unbekannten Quellen stammen. Gleichzeitig wird Chinon zu Hydrochinon reduziert, das man nach Abzentrifugieren der Zellen und Zusatz von Bicarbonat mit *n*/100-Jod titrieren kann. Doch ist die Reduktion des Chinons im Dunkeln keineswegs der entwickelten Kohlensäure äquivalent, da die Decarboxylierung der Glutaminsäure kein Oxydationsvorgang ist. — Geschwindigkeit und Endwert der Kohlensäure steigen zunächst mit der Chinonkonzentration und sinken dann wieder, weil höhere Chinonkonzentrationen die *Chlorella*-Fermente schädigen. — Es ist erstaunlich, wie wenig Chinon genügt, um Kohlensäureentwicklung zu erzeugen. Eine Chinonkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$-*n*. erzeugt bereits eine meßbare Kohlensäureentwicklung aus Glutaminsäure.

In dem Versuch der Abb. 1 wurde das Chinon zu 100 mm^3 *Chlorella* gegeben, die

in 3 cm³ Salzlösung suspendiert waren. Der Gasraum des Manometriegefäßes enthielt dabei Argon. Am meisten Kohlensäure wurde durch 0,1 mg, am wenigsten durch 2,0 mg Chinon entwickelt. Im ersten Fall betrug der Endwert der entwickelten Kohlensäure 57 mm³ aus 100 mm³ Zellen, die Hälfte dieser großen Menge war (bei 20°) in 7 Minuten entwickelt. 40 mm³ von den 57 mm³ Kohlensäure stammten aus der Glutaminsäure, wie durch Austreibung der Kohlensäure mit $n/80$-Fluorid festgestellt wurde. 17 mm³ Kohlensäure also wurden aus einer unbekannten Quelle entwickelt.

Während 0,1 mg Chinon, zu 3 cm³ Salzlösung und 100 mm³ Zellen zugegeben, nicht giftig wirkt, hemmt 0,2 mg Chinon bereits die Sauerstoffatmung und damit die Photosynthese vollständig und irreversibel. Nach Zugabe von 0,1 mg Chinon und Zersetzung der Glutaminsäure unter anaeroben Bedingungen wird die Glutaminsäure beim Übergang zu aeroben Bedingungen wieder aufgebaut und damit die Fähigkeit zur Photosynthese wieder hergestellt.

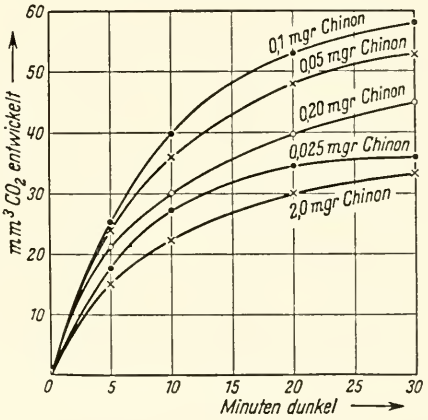


Abb. 1. Kohlensäureentwicklung durch Chinon aus *Chlorella* im Dunkeln. Im Hauptraum 100 mm³ *Chlorella* (2-tägige Südzellen), suspendiert in 3 cm³ Salzsäure K, pH 3,8, in der Birne variierte Mengen Chinon, gelöst in 0,2 cm³ Wasser; im Gasraum Argon. Temperatur 20°. Bei t_0 das Chinon in den Hauptraum gegeben.

Diese Ergebnisse sind von großer methodischer Bedeutung. Wenn man den Einfluß der Kohlensäure auf die HILL-Reaktionen untersuchen will, muß man wissen, daß bei Zugabe von Chinon zu *Chlorella* — im Dunkeln wie im Licht — zunächst große Mengen Kohlensäure entwickelt werden; und wenn der Kohlensäuredruck bei der HILL-Reaktion niedrig und definiert sein soll, so muß diese Kohlensäure vor Einsetzen der Belichtung entwickelt und ausgetrieben werden. Nach dem Gesagten war dafür eine Zugabe von 0,1 mg Chinon zu 3 cm³ Zellsuspension bei einer Einwirkungsdauer von 1 Stunde geeignet, insbesondere bestand keine Gefahr, daß bei dieser Vorbehandlung die Zellen geschädigt wurden.

Macht man entsprechende Versuche mit Chinon im Dunkeln unter aeroben Bedingungen, so findet man, daß 0,1 mg Chinon die Sauerstoffatmung nicht hemmt; daß aber 0,2 mg Chinon die Atmung hemmt und daß dann bald ein großer Sauerstoffverbrauch, jedoch *ohne Kohlensäureentwicklung*, einsetzt, die Wirkung der Carotinoid-Oxygenase, die vor kurzem[10] entdeckt worden ist. Eine methodische Schwierigkeit bei allen aeroben Versuchen mit Chinon und *Chlorella* ist die anfängliche Zersetzung der Glutaminsäure, deren Kohlensäure ohne besondere Kontrollen mit Atmungskohlensäure verwechselt werden kann.

II. Chinon, hell

Da die Chinon-Lichtreaktion der *Chlorella* mit Kalilauge im Einsatz der Manometriegefäße entdeckt worden ist[1], war es von vornherein klar, daß ein Einfluß der Kohlensäure nur bei sehr niedrigen Kohlensäuredrucken gefunden werden konnte; und ferner, daß die Versuche um so aussichtsreicher sein würden, je saurer das Suspensionsmedium war, da dann der Bicarbonatgehalt der Medien um so geringer war. Es war ferner darauf zu achten, daß die Salzlösungen so gepuffert waren, daß der pH-Wert bei der Variation der Kohlensäuredrucke konstant blieb. Pufferung durch *m*/50-Phosphat und pH 3,8 erfüllten diese Bedingungen.

100 mm³ *Chlorella* wurden im Dunkeln in der Salzlösung K, pH 3,8, suspendiert und zunächst 20 Minuten während der Gasdurchleitung mit 0,1 mg Chinon vor-

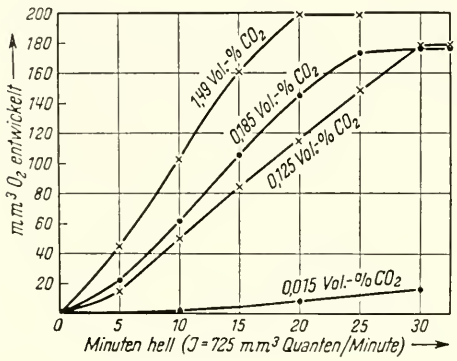


Abb. 2. Einfluß des Kohlensäuredruckes auf die Chinon-Lichtreaktion. Im Hauptraum 100 mm³ *Chlorella* (2-tägige Südzellen), suspendiert in 3 cm³ Salzlösung K, pH 3,8, – 0,1 mg Chinon; in der Birne 2 mg Chinon, gelöst in 0,2 cm³ Wasser; im Gasraum Argon mit verschiedenen Kohlensäuregehalten. Kalilauge im Einsatz nur in dem Versuch der Kurve IV. Temperatur 20°.

behandelt, um den größten Teil der labilen Kohlensäure auszutreiben. Die durchgeleiteten Gase waren Argon mit Zusatz von wenig Kohlensäure, deren Druck manometrisch nach Krebs[11] durch Einkippen von NaJ in Permanganat bestimmt worden war.

Nach Schluß der Hähne wurde noch 40 Minuten im Dunkeln weitergeschüttelt, wobei noch kleine Mengen Kohlensäure im Gasraum erschienen, deren Druck zu dem Kohlensäuredruck der Gasgemische addiert wurde. Dann wurden aus der Birne, noch immer im Dunkeln, 2 mg Chinon in den Hauptraum gegeben, wobei wiederum kleine Kohlensäuredrucke entstanden, die zu dem Kohlensäuredrucke der Gasgemische addiert wurden. Erst dann wurde belichtet und zwar so stark, daß Induktionszeiten möglichst abgekürzt wurden. *Eines* der Gefäße[12] enthielt Kalilauge im Einsatz, für den Kohlensäuredruck in diesem Gefäß kann nur eine obere Grenze angegeben werden.

Ein Versuch ist in Abb. 2 graphisch dargestellt. Wie man sieht, sind die Endwerte des entwickelten Sauerstoffs bei Kohlensäuredrucken von 12,5 bis 149 mm Brodie nahezu gleich und ungefähr dem zugesetzten Chinon äquivalent. Die Geschwindigkeiten der Sauerstoffentwicklung jedoch sind sehr verschieden. Vergleicht man die Maximalgeschwindigkeiten im Verlauf der verschiedenen Kurven, so wird man sagen können, daß 10 mm Brodie der Halbwertdruck und 40 mm Brodie der Ganzwertdruck der Kohlensäure sind. Bei einem Kohlensäuredruck

unter 1,5 mm Brodie war die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung sehr klein.

Diese Versuche können nur so erklärt werden, daß die Kohlensäure auch hier ein Zwischenprodukt der HILL-Reaktion ist, so wie es für die HILL-Reagenzien Salpetersäure und Ferricyanid bereits früher auf andere Art bewiesen worden ist.

Wenn dies stimmt, so sollte für die Geschwindigkeit der Photosynthese in *Chlorella*, unter sonst gleichen äußeren Bedingungen wie pH, Salzlösung, Temperatur und Lichtstärke, der gleiche Kohlensäuredruck maßgebend sein wie für die Chinon-Lichtreaktion. Wurde in einem Manometriegefäß *Chlorella* nach Sättigung mit CO_2-Luft so lange belichtet, bis die Kohlensäure vollständig verbraucht war, und wurde dabei die Änderung der Geschwindigkeit der Photosynthese gemessen, so zeigte sich, daß bei etwa 9 mm *Brodie* die Geschwindigkeit der Photo-

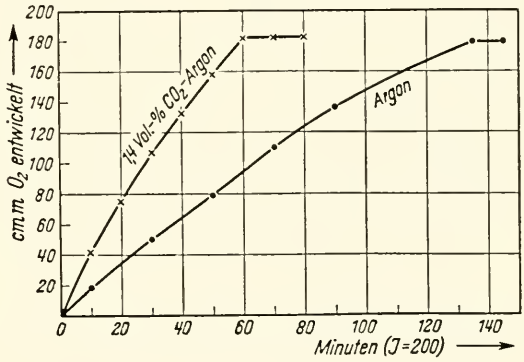


Abb. 3. Versuche mit grünen Grana. Im Hauptraum 3 cm³ Granasuspension. (0,1% KCl), in der Birne 2,1 mg Chinon, im Gasraum Argon oder 1,4 Vol.-% CO_2-Argon. Bei t_0 Chinon aus der Birne eingekippt und 200 mm³ Quanten (weißes Licht) pro Min. eingestrahlt.

synthese auf den halben Wert gesunken war. Wir fanden also für die Geschwindigkeit der Photosynthese nahezu den gleichen Kohlensäure-Halbwertdruck wie in dem Versuch der Abb. 2 für die Geschwindigkeit der Chinon-Lichtreaktion.

III. Grüne Grana

Als Versuchsmaterial dienten Blätter junger Kohlrabipflanzen, die im Warmhaus mit künstlichem Licht gezüchtet worden und sehr reich an Grana waren. Die Grana wurden nach unserer Vorschrift[4] von 1944 isoliert, 1mal mit Wasser gewaschen und dann mit Wasser auf Saftvolumen aufgefüllt. Die Reaktion geht nur nach Zusatz gewisser Salze, von denen Chlorid das wirksamste Koferment ist. Entsprechend unserer Vorschrift von 1944 wurde KCl bis 0,1% zugesetzt.

Die graphische Darstellung in Abb. 3 zeigt, daß nach Zusatz des Chinons der Sauerstoff im Licht etwa zweimal so schnell entwickelt wird, wenn dem Argon 1,4 Vol.-% Kohlensäure zugesetzt wird. Die Endwerte an entwickeltem Sauerstoff dagegen sind nahezu gleich und betragen 83% der aus dem Chinonzusatz berechneten Werte. Es sei hervorgehoben, daß das Argongefäß keine Kalilauge im Einsatz enthielt. Eine Vorbehandlung mit kleinen Mengen Chinon war hier nicht notwendig, da die mit Wasser gewaschenen Grana keine reaktionsfähige Glutaminsäure enthalten.

IV. Trocken-Chlorella

Chlorella (2tägige Südzellen) wurde scharf zusammenzentrifugiert, in möglichst wenig Wasser aufgenommen, in einer Petrischale in einer Schicht von einigen mm Dicke ausgebreitet, mit Trockeneis gefroren und im Vakuum in einigen Stunden getrocknet.

Anders als in den bisher beschriebenen Versuchen wurden die Zellen in die Birne und das Chinon in den Hauptraum gegeben, weil die Trockenzellen, suspendiert in Salzlösungen, in den 20 Minuten Ausgleichszeit bereits erheblich an Wirksamkeit verlieren.

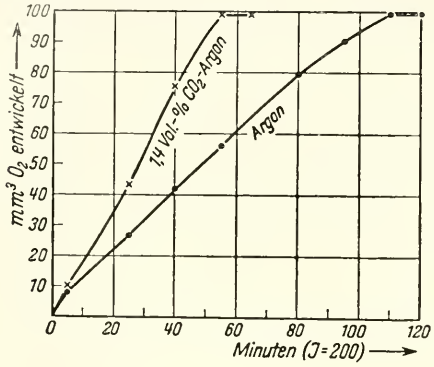


Abb. 4. Versuche mit Trocken-*Chlorella*. Im Hauptraum 3 cm³ Salzlösung S*, pH 4,5. + 2 mg Chinon; in der Birne 25 mg Trocken-*Chlorella* = 100 mm³ frische Zellen; im Gasraum Argon oder 1,4 Vol.-% CO_2-Argon. 5 Min. vor t_0 wurden die Trockenzellen in den Hauptraum gegeben, bei t_0 wurde mit der Belichtung begonnen (200 mm³ Quanten weißes Licht pro Min. eingestrahlt).

Die graphische Darstellung in Abb. 4 zeigt, daß der Sauerstoff im Licht etwa zweimal so schnell entwickelt wird, wenn dem Argon 1,4 Vol.-% CO_2 zugesetzt wird. Die Endwerte an entwickeltem Sauerstoff sind gleich. Sie betragen, wie meistens bei Versuchen mit Trockenzellen, nur etwa 50% der aus dem Chinonzusatz berechneten Werte. Es sei hervorgehoben, daß das Argongefäß keine Kalilauge im Einsatz enthielt.

Literatur

1 Warburg, O., und Negelein, E., Biochem. Z. 110 (1920), 66.
2 Hill, R., Proc. Royal Soc. (London), Ser. B 129 (1940), 238; R. Hill und R. Scarisbrik 129 (1940), 238; Nature (London) 146 (1940), 61.
3 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 10b (1955), 301.
4 Warburg, O., und Lüttgens, W., Die Naturwissenschaften 32 (1944), 161, 301; O. Warburg, Heavy Metals, Clarendon Press, Oxford 1949.
5 Warburg, O., Z. angew. Chem. 69 (1957), 627, Anmerkungen.
6 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12.
7 Warburg, O., Schwermetalle als Wirkungsgruppen, Berlin 1946 und Clarendon Press, Oxford 1949, S. 219.
8 Boyle, Franck P., Science (New York) 108 (1948), 359.
9 Hill, R., Advances in Enzymol. 12 (1951), 1, Seite 35.
10 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H. S., und Voelker, W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 437; Über die Züchtung der Zellen, Z. Naturforschg. 12b (1957), 622.
11 Krebs, H. A., Biochem. Z. 220 (1929), 250.
12 Kastengefäße mit Wanne, nach Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

52 Wirkung von Kohlenoxyd auf Atmung und Photosynthese in grünen Keimblättern*

Von Otto Warburg und Detlev Kayser

In grünen Keimblättern hemmt Kohlenoxyd die Photosynthese in dem Maße, als es die Atmung hemmt. Verschwindet im Lauf der Entwicklung die Kohlenoxydhemmung der Atmung, so verschwindet auch die Kohlenoxydhemmung der Photosynthese. Dies ist ein neuer Beweis für die Funktion der Atmung im Mechanismus der Photosynthese.

Wenn es wahr ist[1], daß in aeroben grünen Zellen[2] die Atmung zum Mechanismus der Photosynthese gehört, und zwar so, daß kein Molekül Kohlensäure ohne Mitwirkung der Atmung photochemisch reduziert werden kann, dann muß ein quantitativer Zusammenhang zwischen Hemmungen der Atmung und der Photosynthese bestehen. Die ersten Keimblätter der Gerste schienen in dieser Hinsicht ein interessantes Versuchsobjekt zu sein, da die jungen Keimblätter nach Angaben der

Abb. 1. Manometriegefäß zur Messung von Atmung und Photosynthese in Blättern.

Literatur gegen Kohlenoxyd empfindlich sein sollen, jedoch bald ihre Empfindlichkeit gegen Kohlenoxyd verlieren sollen. Hier war offenbar eine Möglichkeit gegeben, durch Messung von Atmung und Photosynthese in Kohlenoxyd, in verschiedenen Entwicklungsstadien, den bisherigen Beweisen für den Zusammenhang zwischen Atmung und Photosynthese einen neuen Beweis hinzuzufügen.

Wir haben zu dem Zweck eine einfache manometrische Methode der Messung von Atmung und Photosynthese in Blättern entwickelt, die in Abb. 1 veranschau-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung Band 14b (1959): 563.

licht ist. Die zentral eingebaute Wanne[3] enthält die Keimblätter; das Bicarbonat-Carbonatgemisch[4] am Boden der Gefäße erzeugt den gewünschten Kohlensäuredruck und hält ihn während der Versuche konstant; der Gasraum enthält außerdem Gemische von Argon und Sauerstoff oder von Kohlenoxyd und Sauerstoff. Um hinreichende manometrische Ausschläge zu erhalten, genügten bei den Dunkelversuchen, bei der Messung der Atmung, etwa 300 mg Keimblätter (Frischgewicht), bei den Lichtversuchen, bei der Messung der Photosynthese, 50 mg Keimblätter. Da die Kohlenoxydhemmung der Keimblätter durch Licht, das von Haemoproteinen absorbiert wird, aufgehoben wird, konnte die Photosynthese nur in rotem Licht untersucht werden. Einzelheiten findet man in dem Protokoll am Schluß der Arbeit.

Ergebnisse

Wie die Kohlenoxydhemmung der Atmung nichtgrüner Zellen[5], so ist die Kohlenoxydhemmung der Atmung der grünen Keimblätter vollständig reversibel und abhängig von dem Druckverhältnis CO/O_2. Es gilt nahezu:

$$\frac{CO}{O_2} \cdot \frac{n}{1-n} = K,$$

wo n der Bruchteil der Normalatmung bei dem gegebenen Verhältnis CO/O_2 ist und K die Verteilungskonstante des sauerstoff-übertragenden Ferments zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff bedeutet.

Alter der Keimblätter [Tage]	$\frac{CO}{O_2}$	Hemmung		Verteilungskonstante K $\left(\frac{CO}{O_2} \cdot \frac{n}{1-n}\right)$	
		Atmung [%]	Photosynthese [%]	Atmung	Photosynthese
6	$\frac{98}{2}$	56	59	38	34
6	$\frac{97}{3}$	48,5	50	34	32
6	$\frac{95}{5}$	42,5	38	26	31
6	$\frac{93,5}{6,5}$	27,4	29	38	35
14 (erstes Blatt)	$\frac{98}{2}$	24	20	158	200
19 (erstes Blatt)	$\frac{98}{2}$	11	13	395	321
17 (zweites Blatt)	$\frac{98}{2}$	29	20	119	195
21 (erstes Blatt)	$\frac{98}{2}$	0	0	∞	∞

Tab. 1. Hemmung von Atmung und Photosynthese durch Kohlenoxyd

Wie vorstehende Tabelle zeigt, fanden wir für die Atmung 6tägiger Keimblätter im Mittel $K = 34$, was bedeutet, daß halbe Atmungshemmung durch $CO/O_2 = 34$ erzeugt wird. Nahezu den gleichen K-Wert, nämlich $K = 33$, fanden wir im Mittel für die Hemmung der Photosynthese.

Ließen wir die Keimblätter einige Tage älter werden, so nahm die Kohlenoxydhemmung der Atmung erheblich ab. Für 14- bis 19tägige Keimblätter fanden wir im Mittel $K = 220$, was bedeutet, daß halbe Atmungshemmung durch $CO/O_2 = 220$ erzeugt wird. Nahezu den gleichen hohen K-Wert, nämlich $K = 240$, fanden wir im Mittel in älteren Keimblättern für die Hemmung der Photosynthese.

Waren die Keimblätter noch älter, so fanden wir keine Kohlenoxydhemmung; weder der Atmung, noch der Photosynthese ($K = \infty$).

Das Ergebnis war also nicht nur ein Parallelismus zwischen den Kohlenoxydhemmungen von Atmung und Photosynthese, sondern, was viel mehr bedeutet, eine numerische Gleichheit der Hemmungen. Kohlenoxyd hemmt also die Photosynthese nur insofern, als es die Atmung hemmt, ein neuer Beweis für die Beteiligung der Atmung am chemischen Mechanismus der Photosynthese oder in der

Atmung	Photosynthese
Hauptraum: 3-cm³-Gemisch 85 $m/5$-$NaHCO_3$ + 15 $m/5$-Na_2CO_3	—
Wanne: 343 mg frische Keimblätter	50 mg frische Keimblätter
Gasraum: Argon, 3 Vol.-% O_2 (0,46% CO_2).	→
(min) dunkel (mm)	(min) hell (I_{rot} = 90) (mm)
10 vor	10 vor
10 —8,0	10 +6,5
10 —8,0	10 +7,5
10 —8,0 } 10′—7,5	10 +7,5 } 10′+7,5
10 —7,0	10 +8,5
10 —6,5	10 +7,5
Gasraum CO, 3 Vol.-% O_2	Gasraum CO, 3 Vol.-% O_2
(min) dunkel	(min) dunkel
10 vor	10 vor
10 —4,0 } 10′—3,5	10 —0,5 } 10′—0,5
10 —3,0	10 —0,5
(min) dunkel	(min) hell (I_{rot} = 90)
10 vor	10 vor
10 —3,5	10 +4,0
10 —3,0 } 10′—3,2	10 +3,5 } 10′+3,84
10 —3,0	10 +4,0
Gasraum Argon, 3 Vol.-% O_2	Gasraum Argon, 3 Vol.-% O_2
(min)	(min)
10 vor	10 vor
10 —5,0	10 +6,0
10 —5,0	10 +5,5
10 —5,0 } 10′—5,1	10 +7,0 } 10′+6,5
10 —5,0	10 +7,0
10 —5,5	10 +7,0
47% Hemmung	*46% Hemmung*

Tab. 2. Versuchsbeispiel zu Tab. 1

Sprache der Fermentchemie: Wird das sauerstoff-übertragende Ferment blockiert, so verschwindet die Fähigkeit zur Photosynthese. Offenbar muß dieses Oxydations-Ferment nicht notwendigerweise ein Hämoprotein sein. Denn wenn im Lauf der embryonalen Entwicklung das Hämoprotein durch ein anderes durch CO nicht-hemmbares sauerstoff-übertragendes Ferment ersetzt wird, geht gleichwohl die Photosynthese weiter.

Andere Versuchsobjekte

Von anderen Versuchsobjekten seien die Blätter ausgewachsener Pflanzen erwähnt, deren Atmung nach einer folgenden Arbeit von LEHMANN und BIRKICHT durch Kohlenoxyd nicht gehemmt und deren Photosynthese durch Kohlenoxyd nicht gehemmt wird.

Erwähnt sei schließlich noch *Chlorella*, für die wir früher gefunden haben[6], daß eine reversible und O_2-abhängige Kohlenoxydhemmung auftritt, wenn man *Chlorella* unter Zusatz von Glucose züchtet, also ihre Autotrophie in Heterotrophie umwandelt. *Chlorella* jedoch hat als Versuchsobjekt hier den Nachteil, daß ihr Stoffwechsel, ob autotroph oder heterotroph, durch Kohlenoxyd außerdem z. T. irreversibel und unabhängig vom Sauerstoffdruck gehemmt wird, so daß hier ein Fall vorliegt, in dem Blätter die experimentell einfacheren Versuchsobjekte sind.

Protokoll

Versuchsmaterial. Die Gerstenkeimlinge wurden im Treibhaus in Gartenerde gezüchtet. Nach 6 Tagen hatte das erste Keimblatt eine Länge von 5 bis 7 cm, eine Breite von 0,5 cm, eine Dicke von 0,2 mm und einen Chlorophyllgehalt von 0,16% des Frischgewichts. Für die Messungen wurden die Keimblätter in Teile von 2 cm Länge zerschnitten und mit Metallbügeln in der Wanne, wie aus Abb. 1 hervorgeht, befestigt. Immer standen die Blattstreifen auf dem Boden der Wanne, wo sie in 0,2 cm^3 *m*/50-Phosphat pH 6 eintauchten.

Versuchsanordnung Auf dem Boden des Hauptraums befanden sich 3 cm^3 eines Gemisches von 85 Vol. *m*/5-$NaHCO_3$ und 15 Vol. *m*/5-Na_2CO_3, wodurch ein Kohlensäuredruck von 0,46% einer Atmosphäre[1] erzeugt und im Verlauf der Versuche konstant gehalten wurde. Bei einer Änderung des Gemisches, so daß es mit 0,2% Kohlensäure im Gleichgewicht war, änderte sich die Photosynthese nicht, die Keimblätter waren also bei 0,46% mit Kohlensäure gesättigt. — Das Frischgewicht der Keimblätter in der Wanne betrug etwa 300 mg für die Dunkelversuche und 50 mg für die Hellversuche. — Der Gasraum enthielt außer der Kohlensäure wechselnde Gemische von Kohlenoxyd mit Sauerstoff oder von Argon mit Sauerstoff. Wurde der Stoffwechsel in Argon und Kohlenoxyd verglichen. so waren immer die Anfangsdrucke an Sauerstoff gleich, die sich im Lauf der Versuche nicht weit von den Anfangsdrucken entfernen sollten. — Die Gefäße wurden im Thermostaten bei 20°C mit einer Frequenz von 200 pro Min. horizontal bewegt. — Belichtet wurde mit einer Metallfadenlampe, in der aus Abb. 1 ersichtlichen Weise, wobei die Filter 20 cm Wasser, 1 cm 1-proz. $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ und 2 mm Rotglas II von Schott waren. Dieses rote Licht wird von dem O_2 übertragenden Haemin nicht absorbiert und konnte also die Kohlenoxydhemmungen nicht beeinflussen. Der auf die Keimblätter auftreffende Energiestrom betrug etwa 90 mm^3 Quanten pro Minute. „Weißes" Licht der gleichen Intensität hob die CO-Hemmungen auf.

Versuchsbeispiel. Hemmung von Atmung und Photosynthese durch ein Gemisch von 3 Vol.-% O_2 in CO. Für beide Gefäße $v = 22{,}5\ cm^3$, $v_F = 3{,}2\ cm^3$. Berechnung der Hemmungen aus den Druckänderungen dp/dt, Hellwerte korrigiert für Dunkelatmung. 20°C.

Literatur

1 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 66 und 509.

2 In anaeroben grünen Zellen, falls es solche gibt, würde wahrscheinlich die Gärung an Stelle der Atmung treten.

3 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

4 WARBURG, O., GELEICK, H., und BRIESE, K., Z. Naturforschg. 6b (1951), 285.

5 WARBURG, O., Heavy Metals and Enzyme Action. Clarendon Press, Oxford 1949.

6 WARBURG, O., J. gen. Physiol. 9 (1927), 469.

53 Neubestimmung des Quantenbedarfs der Photosynthese mit der Kompensationsmethode*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Die bisher noch unentschiedene Frage, ob der Quantenbedarf der CO_2-Spaltung bei der Photosynthese 4 oder kleiner als 4 ist, wurde mit einer verbesserten Kompensations-Methode von neuem untersucht, mit dem Ergebnis, daß 2,8 Quanten benötigt werden, um 1 CO_2 zu spalten. Da 2,7 der kleinste energetisch mögliche Quantenbedarf an der roten Wirkungsgrenze bei 680 mμ ist, so kann also im Rot nahezu 100% der eingestrahlten Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt werden. Da bei Änderung der Wellenlänge die benötigte Quantenzahl gleich bleibt, so wird die Ausbeute an chemischer Energie beim Übergang zu kürzeren Wellenlängen kleiner und beträgt im Blau bei 436 mμ etwa 64 Prozent.

Da es keine wichtigere Zahl** in der Biophysik gibt, als den Quantenbedarf der Photosynthese, und da es noch nicht endgültig entschieden ist, ob die Spaltung eines CO_2-Moleküls 4 oder weniger Lichtquanten erfordert, so haben wir eine Neubestimmung des Quantenbedarfs vorgenommen und zwar mit der Kompensations-Methode[1], die wir für diesen Zweck weiter verbessert und vereinfacht haben. Bei der Kompensations-Methode wird mit so dichten Zellsuspensionen gearbeitet, daß das eingestrahlte Licht vollständig oder fast vollständig absorbiert wird. Wegen der notwendigen Zelldichte muß man dabei eine größere Atmung in Kauf nehmen, die jedoch nicht stört, wenn man sie mit diffusem Licht kompensiert. Zu den Zellen, deren Atmung kompensiert ist, werden dann die gemessenen Lichtstrahlen hinzugefügt, und für diese Licht-*Inkremente* wird die Wirkung des Lichts gemessen (Abb. 1).

Die Kompensationsmethode, in einer primitiven Form, wurde zuerst im Frühjahr 1949 gemeinsam mit amerikanischen Kollegen in Bethesda entwickelt und angewandt[2]. Mit ihr haben dann im Sommer 1949 Studenten der Biologie in Woods Hole (Mass.) — in denkwürdigen Versuchen[3] — den Quantenbedarf der Photosynthese bestimmt und Quantenzahlen um 4 gefunden, die während des Krieges von James Franck und seinem Arbeitskreis bestritten worden waren. Später, nachdem wir das Prinzip der Ulbrichtschen Kugel[4] für die Energetik der Photosynthese nutzbar gemacht hatten, wurden die Methoden, die ohne Kompensation, mit wenig Zellen und kleiner Lichtabsorption arbeiten, hinzugefügt[5]. Aber diese Methoden erfordern Apparate, die heute den meisten Forschungsinstituten noch nicht zur Verfügung stehen, während die Kompensationsmethode überall ausgeführt werden kann.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, 15b (1960): 190.

** *Zusatz 1961.* In den letzten Jahren wird die Bedeutung dieser Zahl von denjenigen bestritten, die statt 3 die Zahl 15 gefunden hatten; und es wird hervorgehoben, daß sich eine Diskussion dieser Zahl ohnehin erübrigen werde, wenn dereinst der chemische Mechanismus der Photosynthese aufgeklärt worden sei. Es hat den Anschein, daß aus analogen Gründen bald auch der chemische Mechanismus der Photosynthese als unwichtig erklärt werden wird.

Es ist der große Vorteil der Kompensations-Methode, daß Fehler bei der Messung der Lichtabsorption dabei keine Rolle spielen, da es für den Quantenbedarf gleichgültig ist, ob eine Zellsuspension 95% oder 96% des eingestrahlten Lichts absorbiert. Der Einwand, der Quantenbedarf der Kompensation sei unbekannt und möglicherweise sehr groß, ist nunmehr dadurch entkräftet worden, daß es gelungen ist, den Quantenbedarf der Kompensation zu messen. Wie zu erwarten

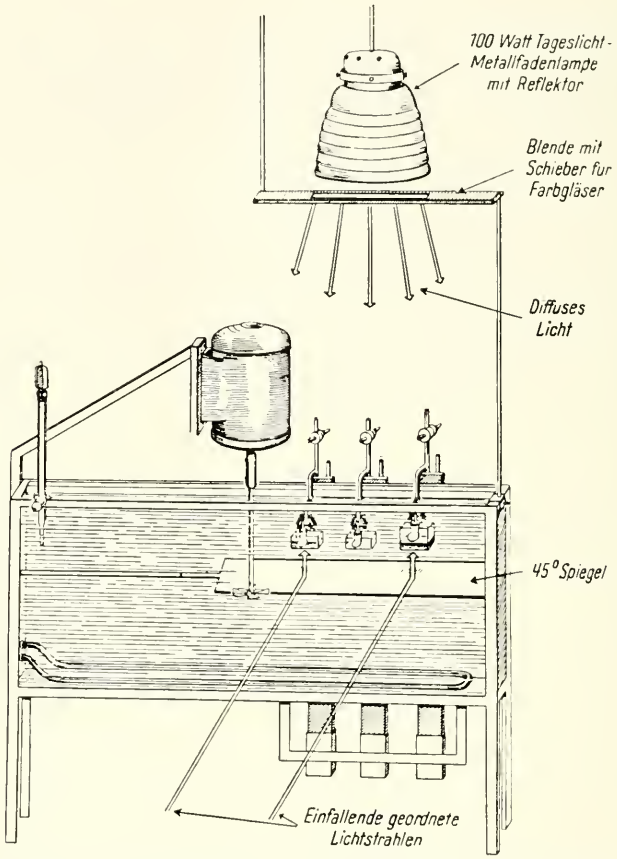


Abb. 1. Methode zur Bestimmung des Quantenbedarfs der CO_2-Spaltung mit Kompensation der Atmung.

war, wurde für das diffuse Kompensationslicht derselbe Quantenbedarf gefunden, wie für die hinzugefügten geordneten Strahlen.

Die allgemeine Versuchsanordnung ist aus Abb. 1 ersichtlich. In 2 Manometriegefäße von gleicher Form, aber verschiedenem Volumen, werden je 200 mm^3 *Chlorella*, suspendiert in 7 cm^3 Kulturlösung, eingefüllt. Über dem Thermostaten brennt, an einer Stange verschiebbar, eine 100-Watt-Metallfadenlampe innerhalb einer blauen Kugel. Diese „Tageslichtlampe" erfüllt den Thermostaten mit diffusem Licht, das 20% blaue und blaugrüne Quanten enthält; das von allen Seiten in die Zellsuspensionen eindringt; und das von den Zellsuspensionen vollständig absorbiert wird. Zur Messung der absorbierten Quantenintensität des Kompen-

sationslichts substituierten wir die Versuchsgefäße durch Aktinometergefäße[5a], die sich von den Versuchsgefäßen nur dadurch unterschieden, daß sie an Stelle der Zellsuspension eine Lösung von Phaeophorbid und Thioharnstoff in Pyridin enthielten. Diese Flüssigkeit absorbierte das eingestrahlte Licht vollständig und verbrauchte dabei ebensoviele O_2-Moleküle, als Lichtquanten eingestrahlt wurden. Dann ist der *Verbrauch* des O_2 im Aktinometer, dividiert durch die *Entwicklung* des O_2 in der Zellsuspension gleich dem Quantenbedarf für das vom Chlorophyll absorbierte Kompensationslicht

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{O_2\text{-Verbrauch im Aktinometer} \cdot 0{,}9}{O_2\text{-Entwicklung in der Zellsuspension}},$$

wo 0,9 der Faktor ist, der die Absorption des blaugrünen Lichts in den Carotinoiden eliminiert.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, werden die Lichtinkremente in Form von zwei geordneten Lichtstrahlen hinzugefügt. Sie werden aus *einem* Lichtstrahl durch Teilung mit 4 totalreflektierenden[6a] Prismen gewonnen, bolometrisch gemessen und bolometrisch auf Gleichheit justiert. Sie werden in der Zellsuspension vollständig (Rot) oder fast vollständig (Grün) absorbiert und erzeugen, da die Atmung kompensiert ist, im wesentlichen positive Drucke, aus denen der entwickelte O_2 nach den Formeln der 2-Gefäßmethode berechnet wird. Entwickelt dabei die eingestrahlte Lichtintensität $\mathcal{J}$ in t Minuten x mm^3 O_2, und ist α der absorbierte Bruchteil von $\mathcal{J}$, so ist der Quantenbedarf für das Licht des Inkrements, wenn $\mathcal{J}$ in mm^3-Quanten/Minuten ausgedrückt wird

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{\alpha \cdot \mathcal{J} \cdot t}{x_{O_2}}$$

wo $1/\varphi$ sehr genau bestimmt werden kann, da man die Bestrahlungszeiten t und damit die O_2-Entwicklung x_{O_2} beliebig vergrößern kann. Den absorbierten Bruchteil α der eingestrahlten Intensität bestimmen wir in jedem Fall, indem wir die Manometriegefäße in der Mitte einer Ulbrichtschen Kugel[4] wie bei der Ausbeutebestimmung bewegen. Enthalten die Manometriegefäße 200 mm^3 *Chlorella* pro Gefäß, so finden wir im Rot $\alpha = 1$ und im Grün $\alpha = 0{,}93$ bis $0{,}95$.

Wenn nun durch die fast vollständige Lichtabsorption und die Kompensation der Atmung die wesentlichen physikalischen und chemischen Schwierigkeiten der Ausbeutebestimmungen überwunden sind, so scheint es zunächst, daß die Ausbeute bei der Photosynthese heute ebenso leicht gemessen werden kann, wie bei einfachen photochemischen Reaktionen. Das dem nicht so ist, rührt von der unerwarteten Tatsache her, daß die Zellen von ihrer Fähigkeit, das Licht vollständig auszunutzen, im allgemeinen keinen Gebrauch machen, sondern daß sie im Gegenteil mit Hilfe der verschiedensten Mechanismen die Ausnutzung des Lichts niedrig halten. Zum Beispiel hat sich ergeben, daß bei der künstlichen Zucht von *Chlorella* Zellen, die das Licht gut ausnutzen, nur dann entstehen, wenn die Intensität der Metallfadenlampe in 24-Stunden-Perioden fluktuiert, wie in der freien Natur[6]. Es hat sich ferner ergeben, daß Zellen, denen man das blaugrüne Licht[7] entzieht, sofort beginnen, das Licht anderer Wellenlängen schlechter auszunutzen, so daß die vorher maximale Ausbeute im Lauf von Stunden auf nahezu Null herunter-

gehen kann. Weiter hat sich erwiesen, daß die unvermeidlichen Maßnahmen, die zur Vorbereitung der Zellen für die Ausbeutebestimmungen notwendig sind — z. B. Zentrifugieren der Zellen, wobei sie zeitweise unter Sauerstoffmangel kommen —, die Ausnutzung des Lichts erheblich verschlechtern, und daß die Ausnutzung des Lichts erst wieder gut wird, wenn die Zellen nach Einfüllen in die Manometriegefäße zunächst längere Zeit im blaugrünen Licht geschüttelt werden.

Wenn nun auch alle diese Hemmungen der Lichtwirkung ihren Sinn[8] haben und biologisch interessant sind, so erschweren sie doch die Arbeit des Physico-Chemikers, den nur die maximalen Ausbeuten interessieren und der unsicher wird, wenn

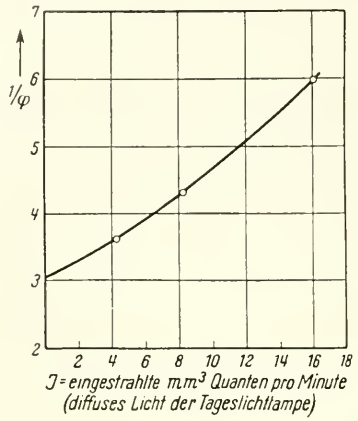


Abb. 2. Quantenbedarf der Kompensation der Atmung $1/\varphi = 3{,}06$ für $J = 0$.

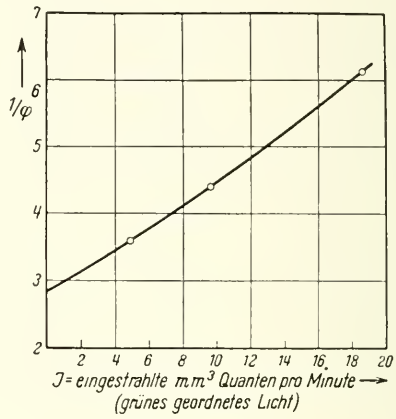


Abb. 3 Quantenbedarf der Sauerstoffentwicklung aus den kompensierten Zellen. $1/\varphi = 2{,}85$ für $J = 0$.

er die maximalen Ausbeuten nicht ausnahmslos erhält. Erst durch die Entdeckung der Hemmungen und die Kenntnis, wie sie vermieden werden, ist die notwendige Sicherheit auf diesem Gebiet erreicht worden. Heute würden wir uns sehr wundern, wenn es vorkäme, daß bei Befolgung unserer Vorschriften noch eine schlechte Ausbeute gefunden würde.

Ergebnisse

Das Ergebnis von zwei Versuchen, die im experimentellen Teil genau beschrieben sind, ist in den Abb. 2 und 3 zusammengefaßt, wo die gefundenen $1/\varphi$-Werte gegen die eingestrahlte Lichtintensität aufgetragen sind. Der Quantenbedarf wird kleiner, wenn die Lichtintensität sinkt, und erreicht für $J = 0$ den Grenzwert, der nach den Abb. beträgt:

für die Kompensation der Atmung	$1/\varphi = 3{,}06$
für die O_2-Entwicklung aus den kompensierten Zellen	$1/\varphi = 2{,}85$

Abb. 4 gehört zu Abb. 3 und ist die graphische Darstellung der beobachteten Druckänderungen in den beiden Manometriegefäßen. Es ist das Modell eines Ver-

suchs, wie er sein soll, mit langen Versuchszeiten und großen manometrischen Ausschlägen. Der prozentische Fehler bei der Berechnung der O_2-Entwicklung aus den manometrischen Ausschlägen ist um so kleiner, je größer die Differenz der Ausschläge in dem großen und kleinen Manometriegefäß ist.

Unser Ergebnis ist also, daß der Quantenbedarf der CO_2-Spaltung bei etwa 2,85 liegt und damit dem energetisch möglichen Quantenbedarf an der roten Wirkungsgrenze bei 680 mμ, der $\frac{112000}{41600} = 2{,}7$ ist, nahekommt. Da ferner der Quantenbedarf für das vom Chlorophyll absorbierte Licht in allen Spektralbezir-

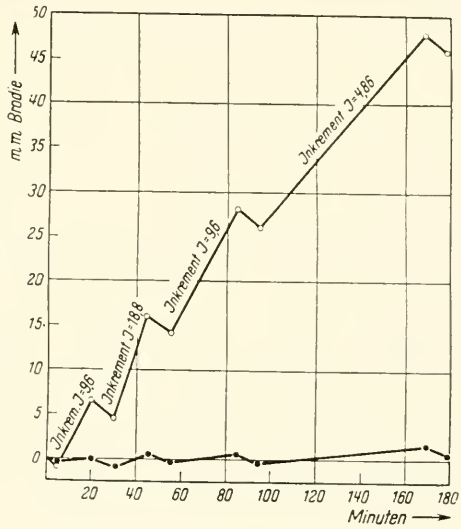


Abb. 4 Beobachtete Druckänderungen in den beiden Manometriegefäßen der 2-Gefäßmethode bei dem Versuch der Abb. 3:

obere Kurve: kleines Gefäß
untere Kurve: großes Gefäß

Atmung mit Tageslichtlampe fast kompensiert. Lichtinkrement grüner Strahl, 540—568 mμ. (200 mm³ *Chlorella* in 7 cm³ Kulturlösung. Gasraum 10 Vol.-% CO_2-Luft. Temperatur 20°.) Aus den Druckänderungen berechnete $1/q$-Werte in Abb. 3.

ken des sichtbaren Lichts der gleiche ist[9], so beträgt der Gewinn an chemischer Energie für das von dem Chlorophyll absorbierte Licht bei

(mμ)	(%)
436	62
546	78
680	96

Es darf dabei nicht auffallen, daß der Quantenbedarf der CO_2-Spaltung keine ganze Zahl ist. Denn der Mehrquantenbedarf der CO_2-Spaltung kommt dadurch zustande[10], daß 1 Lichtquantum aus einem Peroxyd 1 Molekül O_2 entwickelt und daß dieser O_2 teilweise mit Kohlehydrat zurückreagiert, um die Energie für Neubildung des Peroxyds zu liefern. Reagiert genau $^2/_3$ des O_2 zurück, so ist der Quantenbedarf der Bilanz 3. Reagiert weniger als $^2/_3$ zurück, so ist der Quantenbedarf der Bilanz kleiner als 3.

Schließlich haben wir für diejenigen, die über keine Einrichtungen zur Teilung und Justierung von Lichtstrahlen verfügen, eine sehr einfache Methode zur Messung der Ausbeute mit *einem* Lichtstrahl und *einem* Gefäß ausgearbeitet. Wir benutzen dazu unsere Bicarbonat-Carbonatgemische[11], die aber, anders als früher, in den Manometriegefäßen räumlich von den Algenzellen getrennt sind. Die

Zellen befinden sich dabei im Hauptraum der Manometriegefäße in ihrem natürlichen Kulturmedium; die Carbonatgemische aber befinden sich in einem geräumigen Anhänger, der durch einen kurzen breiten Gang vom Hauptraum getrennt ist. Bei dieser Anordnung kann man die Konzentration der Carbonatgemische beliebig steigern, da es ja die Zellen nicht schädigen kann. Wir benutzen 2-*m*. Gemische von $KHCO_3$ und K_2CO_3 und können damit Kohlensäuredrucke bis zu $2^1/_2$% einer Atmosphäre so gut konstant halten, daß wir den entwickelten Sauerstoff mit der einfachen k_{O_2}-Konstanten berechnen können ($x_{O_2} = h \cdot k_{O_2}$).

War alles übrige im wesentlichen wie bei der Zweigefäß-Methode nach Abb. 1, so erhielten wir mit der neuen Ein-Gefäßmethode für *Chlorella* im Rot, wenn die Atmung mit Blaugrün kompensiert war:

CO_2 Druck (mm Brodie)	Quantenbedarf pro Molekül O_2
8,0	21
31,0	6,7
75,5	3,6
140,0	2,83
202,0	2,75

Man beachte die sehr erhebliche Abhängigkeit des Quantenbedarfs von dem Kohlensäuredruck. Das Bicarbonat-Carbonatgemisch, in dem EMERSON[12] vor 20 Jahren die maximale Ausbeute bei der Photosynthese der *Chlorella* zu bestimmen glaubte, war mit einem CO_2-Druck von nur 22 mm Brodie im Gleichgewicht und konnte also nach obiger Tabelle nur einen kleinen Bruchteil der maximalen Ausbeute liefern. Tatsächlich fand EMERSON[12] vielfach einen Quantenbedarf von 20 und dies sind die Versuche, auf denen FRANCK[13] im wesentlichen seine Thermodynamik der maximal möglichen Ausbeute bei der Photosynthese aufbaute.

Wir danken auch hier Herrn EARLE K. PYLER, Chief Radiometry Section, Bureau of Standards, Washington, für die Neu-Eichung des Standards C-932. Mit diesem Standard sind die anderen Standards nachgeprüft und stimmend gefunden worden, die für diese Arbeit benutzt wurden.

1. Allgemeine Versuchsanordnung

Chlorella pyrenoidosa wurde im fluktuierenden Licht[14] (3 Stdn., 9 Stdn., 3 Stdn., 9 Stdn.) einer 300-Watt-Metallfadenlampe 48 Stdn. gezüchtet und am Ende der Dunkelperiode geerntet. Die Kulturlösung war: 5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 2,5 g KH_2PO_4 + 2 g NaCl + 2 g KNO_3 + 0,5 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ zu 1 *l* aus einem Quarzgefäß dest. Wasser. pH etwa 4,3. 250 cm³ davon + 2cm³ der Lösung der Mikroelemente + 0,1 cm³ (= 0,1 mg) $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$, diese Lösung im Dunkeln aufbewahrt.

Lösung der Mikroelemente: 500 mg $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 1000 mg $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\,H_2O$ + 300 mg Borsäure + 200 mg $MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$ + 22 mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 5 mg $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mg $(NH_4)_6\,Mo_7O_{24} \cdot 4\,H_2O$ + 1000 cm³ *n*/200-H_2SO_4.

Die Zellen vermehrten sich in 250 cm³ Kulturlösung in 48 Stdn. von 60 auf 310 Kubikmillimeter.

Die geernteten Zellen wurden mit Kulturlösung, aber ohne Zusatz von Mikroelementen, 1-mal auf der Zentrifuge gewaschen und in Kulturlösung suspendiert. Zur Messung der Lichtwirkung wurden je 7,2 cm³, enthaltend 200 mm³ Zellen, in 2 Kastengefäße mit Ansatzbirne[15] eingefüllt und nach den Vorschriften der 2-Gefäßmethode im Thermostaten bei 20° mit einer Frequenz von 200 pro Min. geschüttelt. Der Gasraum enthielt 10 Vol.-% CO_2-Luft.

Die Versuchszeit betrug etwa 8 Stunden. Während der ganzen Zeit wurde ununterbrochen mit dem Licht der Tageslichtlampe, wie in Abb. 1 erläutert, diffus aus einer derartig regulierten Entfernung belichtet, daß die Atmung der Zellen nahezu kompensiert war. In geeigneten Zeitabständen wurde dann rotes oder grünes Licht in Form geordneter Strahlen zu dem kompensierenden diffusen Licht hinzugefügt, das zu 20% aus Blau und Blaugrün und zu 80% aus Grün, Gelb

und Rot (520 bis 620 mμ) bestand. Die Quantenintensitäten sowohl des diffusen als auch des geordneten Lichts waren gemessen, das diffuse Licht mit dem Aktinometer, das geordnete Licht mit dem Bolometer.

Sinn der kontinuierlichen diffusen Bestrahlung war die Zufuhr der notwendigen Menge Blaugrün[11]; die Beseitigung aller mit der Atmung zusammenhängenden Komplikationen; und die vollkommene Ausleuchtung der Manometriegefäße, die bei Bestrahlung mit geordnetem Licht nicht zu erreichen ist. Der Erfolg war, daß man in sehr langen Versuchszeiten maximale Ausbeuten erhielt. Wurde die Tageslichtlampe soweit entfernt, daß nur noch wenig Atmung kompensiert war, oder wurde aus der nahen Tageslichtlampe mit einem Orangeglas das Blaugrün fortgenommen, so fiel der günstige Einfluß des diffusen Lichts fort und die Ausbeute sank bei Zufuhr der roten oder grünen Strahlen dauernd ab.

Dabei wurde die methodisch wichtige Beobachtung gemacht, daß die vollständige Erholung der Zellen nach der Ernte, dem Zentrifugieren und Waschen oft einige Stdn. in Anspruch nimmt. Es wurde deshalb vor Beginn der Ausbeutemessungen immer 2 bis 3 Stdn. im diffusen Blaugrün geschüttelt, wobei man den Anstieg der Lichtwirkung dadurch erkennen konnte, daß die kompensierende Lampe weiter und weiter von den Manometriegefäßen entfernt werden mußte, wenn die Atmung eben kompensiert bleiben sollte.

2. *Messung des diffusen Kompensationslichts mit dem Quanten-Aktinometer*

Das diffuse Kompensationslicht wurde gemessen, indem in den Manometriegefäßen die Zellsuspension durch die aktinometrische Flüssigkeit ersetzt wurde (5 mg Phaeophorbid a + b, 300 mg Thioharnstoff, 7 cm^3 Pyridin pro Gefäß). Die Gefäße wurden dann in ihrem Gasraum mit O_2 gefüllt und im Thermostaten an denselben Stellen im diffusen Licht geschüttelt, wie bei den Photosynthese-Versuchen. Dabei mußte die Intensität des diffusen Lichts soweit geschwächt werden, daß die für das Aktinometer[17] vorgeschriebene gesamte Einstrahlung — 1 mm^3 Quanten pro Min. — nicht überschritten wurde. Dies geschah durch Einschieben von Rauchgläsern bekannter Durchlässigkeit in die Blende der Abb. 1.

Sowohl von den Zellen als auch von der Aktinometer-Flüssigkeit wurde das eingestrahlte diffuse Licht der Tageslichtlampe vollständig absorbiert und zwar bereits von kleinen Schichtdicken. Im Fall der Zellsuspension war dann eine Zerstreuungs-Reflexion vorhanden, die bei der Aktinometer-Flüssigkeit nicht zu finden war. Aber diese Zerstreuungs-Reflexion ist unter diesen Umständen, wie wir früher nachgewiesen haben[18], so geringfügig, daß sie hier ganz vernachlässigt werden konnte. Da die Absorption durch die Zellen und durch die Aktinometer-Flüssigkeit vollständig war und da die Zerstreuungs-Reflexion der Zellen zu vernachlässigen war, ergab der O_2-Verbrauch im Aktinometer direkt die von den Zellen absorbierte Quantenintensität durch die Gleichung

$$\mathcal{J} = \frac{x}{t} \left[\frac{\text{mm}^3 \text{ Quanten}}{\text{Minuten}}\right]$$

wo x der in t Min. im Aktinometer verbrauchte O_2 ist. $\mathcal{J}$ kann auf diese Weise beliebig genau bestimmt werden, da das Aktinometer im Dunkeln keinen O_2 verbraucht und also x durch Verlängerung von t beliebig vergrößert werden kann.

3. *Die geordneten Lichtstrahlen*

Die Lichtquelle war eine 500-Watt-Metallfadenlampe (Kinolampe), die mit konstant gehaltener Spannung brannte. Ein mit Kondensor, Linsen und Blenden isolierter geordneter Strahl wurde mit 4 Prismen[19] in 2 Strahlen geteilt, deren Intensität mit dem Bolometer gemessen und auf gleiche Quantenintensität justiert wurde. Die Teilung des Lichtstrahls mit dem teildurchlässigen Spiegel[20] benutzen wir heute nur noch zur Teilung spektral reinen Lichts (Linien), und wenn die Leuchtfläche der Lichtquelle unruhig steht, da die Teilung mit dem Spiegel, anders als die Teilung mit den Prismen, spektral nicht indifferent ist.

Die Farbfilter waren:

Für Grün: 5 cm strömendes Wasser, 2 cm 10-proz. $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 10 mm Didymglas + 2 mm Orangeglas O.G. 1 (540—568 mμ).

Für Rot: 5 cm strömendes Wasser, 2 cm 2-proz. $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ + 2 mm Rotglas R. G. 1 (610 bis 675 mμ).

Die Absorption dieser Strahlen in den 200-mm^3-Zellen war zwar fast vollständig, wurde aber in jedem Fall in der *Ulbricht*schen Kugel für das bewegte Gefäßpaar gemessen.

Zur bolometrischen Messung der grünen und roten Strahlen wurden die Manometriegefäße aus

dem Thermostaten herausgenommen, so daß die Strahlen den Thermostaten in vertikaler Richtung verließen. Sie wurden mit 45°-Spiegel und Linse auf die Platinstreifen des Bolometers konzentriert. Die Durchlässigkeit dieses Spiegels + Linse war dann die einzige Bolometer-Korrektion, die anzubringen war. Sie sind von der Wellenlänge abhängig und betrugen für Spiegel + Linse.

(mμ)	Durchlässigkeit
546	0,848
578	0,845
644	0,830

Das Bolometer war beim Versuch und bei der Eichung mit einem Lithiumfluorid-Fenster verschlossen. Zur Eichung dienten Standard-Lampen (Kohlefadenlampen) des Bureau of Standards in Washington.

Zur Beurteilung der Genauigkeit der bolometrischen Messungen sei angeführt, daß in unserer Bolometeranordnung der Standard in 2 Meter Entfernung einen Ausschlag von 34 μV gab und daß unsere niedrigste Versuchsintensität im Grün — 5 mm³ Quanten pro Min. — 93 μV ergab. Die Strahlungsmessung mit dem Bolometer war also sehr genau, ihre Fehler waren im Zusammenhang dieser Arbeit zu vernachlässigen.

4. *Manometrie*

Die Volumina des Gefäßpaares waren:

Großes Gefäß 29,998 cm³ Kleines Gefäß 17,433 cm³.

Wurden in jedes Gefaß 7,2 cm³ eingefüllt, so waren bei 20° die Gefäßkonstanten in mm²

Großes Gefäß		Kleines Gefäß	
$k_{O_2} = 2{,}146$	$k_{CO_2} = 2{,}756$,	$k'_{O_2} = 0{,}975$	$k'_{CO_2} = 1{,}586$,

woraus folgt

$$x_{O_2} = H' \cdot 4{,}623 - H \cdot 8{,}035, \qquad [1]$$

$$x_{CO_2} = - H' \cdot 5{,}940 + H \cdot 13{,}08. \qquad [2]$$

Das Gasraum enthielt 10 Vol.-% CO_2-Luft. Die Schüttelfrequenz betrug 220 pro Min. mit Exkursionen von 0,5 cm nach jeder Seite. Die Gefäße waren im Thermostaten so montiert, daß die Böden der beiden Gefäße auf gleicher Höhe waren.

Je niedriger die eingestrahlten Lichtintensitäten waren, um so längere Versuchszeiten wurden gewählt, damit die manometrischen Ausschläge hinreichend groß wurden. Bei den Messungen der Ausbeuten im Kompensationslicht lagen die Druckänderungen naturgemäß im negativen, bei den Messungen der Ausbeuten für das zusätzliche rote oder grüne Licht lagen die Druckänderungen im wesentlichen im positiven.

Der Fehler bei der Messung von x_{O_2} beträgt $\pm$ 0,5 mm, der prozentische Fehler in x_{O_2} hängt im wesentlichen von der Differenz der Ausschläge im großen und kleinen Gefäß ab und kann in jedem Fall durch Einsetzen der Fehler in obige Gl. [1] hingeschrieben werden. In dem Versuch der Abb. 4 — der das Modell für eine Ausbeutebestimmung ist — betrug der prozentische Fehler in x_{O_2}, wie man sich mit Hilfe der Gl. [1] überzeuge, zwischen 4 und 10 Prozent.

5. *Atmungskohlensäure und Kompensation der Atmung*

Kompensiert Licht die Atmung, so geht der Weg, wie früher gezeigt worden ist[21], über die Atmungskohlensäure und nicht, wie in der älteren Literatur vielfach angenommen wurde, über Vorstufen der Atmungskohlensäure. Denn man erhält keine Kompensation der Atmung von *Chlorella*, wenn man bei der manometrischen Anordnung durch Kalilauge im Einsatz die Atmungskohlensäure entfernt. Bei derartigen Versuchen, bei denen Licht und Kalilauge um die Atmungskohlensäure konkurrieren, muß die Lichtstärke niedrig und die Entfernung der Kohlensäure schnell sein.

Besonders geeignet für die Versuche sind die neuen Wannengefäße[22], in denen die Kalilauge mit Glasperlen in einer im Hauptraum befestigten Wanne geschüttelt wird. Zum Beispiel enthielt der Hauptraum eines Wannengefäßes 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ Kulturlösung, der Gasraum enthielt Luft, die Temperatur war 20°, die Schüttelfrequenz betrug 220 pro Min., die Wanne enthielt entweder 0,2 cm³ 20-proz. Kalilauge oder, zur Kontrolle, 0,2 cm³ Wasser. Wurde mit dem diffusen Licht der Tageslichtlampe nach Abb. 1 belichtet, so wurde eine sehr erhebliche

Hemmung der Lichtwirkung durch die Kalilauge gefunden, eine um so größere Hemmung, je niedriger die eingestrahlte Lichtintensität war (Tab. 1). In dem Versuch der Tab. 1 bringt die Kalilauge bei der höheren Lichtintensität 77% und bei der niedrigeren Intensität 89% der Lichtwirkung zum Verschwinden.

Auf Grund dieses Ergebnisses, das den Weg über die Kohlensäure beweist, ist der Mechanismus der Photosynthese unterhalb und oberhalb des Kompensationspunktes der gleiche, und es ist gleichgültig, auf welcher Seite des Kompensationspunktes man die Ausbeute bestimmt.*

6. *Quantenbedarf im diffusen Licht*

Die Bestimmung des in die Manometriegefäße eingestrahlten diffusen Lichts, die mit dem Bolometer nicht möglich ist, war leicht mit Hilfe des Aktinometers, wie in Abschnitt 2 erläutert. Die allgemeine Versuchsanordnung ergibt sich aus Abb. 1, aus der die beiden geordneten Lichtstrahlen wegzudenken sind. Ein Versuchsbeispiel ist in der Tab. 2 wiedergegeben.

Eingestrahltes Licht [mm³ Quanten/min]	Belichtungszeit [min]	Lichtwirkung (X_{O_2}) Hell- minus (X_{O_2}) Dunkel [mm³]		$\frac{1}{q}$	
		— KOH	+ KOH	— KOH	+ KOH
4,18	30	29,3	6,8	*4,27*	*18,4*
2,30	30	23,4	2,55	*3,0*	*27,0*

Tab. 1. Einfluß von Kalilauge im Einsatz auf die Lichtwirkung.

Eingestrahltes J [mm³ Quanten/min]	Belichtungszeit [min]	*Druckänderung durch Licht*				Berechnet nach Gl. (1) u. (2)
		Großes Gefäß [mm Brodie]		Kleines Gefäß [mm Brodie]		
Dunkel	10	— 1		—7,5		X_{O_2} = + 72,9 mm³ O_2
						X_{CO_2} = — 85,6 mm³ CO_2
J = 16	30	0	30′ + *3*	—1,5	30′ + *21*	γ = — 1,175
						$1/q$ = *6,57*
Dunkel	10	— 1		—7,5		X_{O_2} = + 52,3 mm³ O_2
						X_{CO_2} = — 63,1 mm³ CO_2
J = 8,27	30	— 1	30′ + *2*	—7,5	30′ + *15*	γ = — 1,205
						$1/q$ = *4,75*
Dunkel	10	— 1		—7,5		X_{O_2} = + 31,3 mm³ O_2
						X_{CO_2} = — 36,7 mm³ CO_2
J = 4,18	30	— 2	30′ + *1*	—14	30′ + *8,5*	γ = — 1,18
						$1/q$ = *4,00*
Dunkel	10	— 1		—7,5		

Tab. 2. Messung des Quantenbedarfs bei Bestrahlung mit dem diffusen Kompensationslicht. J = eingestrahlte = absorbierte Quantenintensität in mm³ Quanten pro Minute. 200 mm³ Zellen pro Gefäß. Gasraum 10% CO_2-Luft. 20°.

Bedenkt man, daß die Tageslichtlampe 20% Blaugrün enthält, von dem nur etwa die Hälfte von dem Chlorophyll absorbiert wird, so erhält man die $1/q$-Werte für das vom Chlorophyll absorbierte Licht, indem man die gemessenen, in Tabelle 2 verzeichneten $1/q$-Werte mit 0,9 multipliziert.

* *Zusatz 1961.* Diese Ergebnisse und Überlegungen sind wesentlich für die Ausbeutebestimmungen mittels der Kompensationsmethode. Tabelle 1 ist deshalb methodisch wesentlich.

Dann sind die $1/\varphi$-Werte

$\mathcal{J}$ [mm³ Quanten pro Min.]	$1/\varphi$ gemessen	$1/\varphi$ auf Chlorophyll-absorption umgerechnet
16	6,57	5,92
8,27	4,75	4,28
4,18	4,0	3,60

Trägt man die auf Chlorophyllabsorption umgerechneten $1/\varphi$-Werte als Funktion der Quantenintensität $\mathcal{J}$ auf, so erhält man die Kurve der Abb. 2 (vgl. Einleitung), die die Ordinatenachse bei $1/\varphi = 3{,}06$ schneidet. Der Grenzwert von $1/\varphi$ für $\mathcal{J} = 0$ ist also 3,06.

7. *Quantenbedarf im geordneten Licht (Lichtinkrement)*

Die Bestimmung des in die Zellen eingestrahlten geordneten Lichts geschah bolometrisch, wie in Abschnitt 3 erläutert. Steht kein Bolometer zur Verfügung, so kann auch das geordnete Licht mit dem Aktinometer gemessen werden. Die allgemeine Versuchsanordnung ist aus Abb. 1 ersichtlich. Es ist hervorzuheben, daß die Kompensationslampe während der ganzen Versuchszeit eingeschaltet blieb, während das geordnete Licht in geeigneten Zeitperioden hinzugefügt oder wieder fortgenommen wurde.

Ein Versuchsbeispiel, bei dem das geordnete Licht grünes Licht war, ist in Tab. 3 zahlenmäßig und in Abb. 4 (Einleitung) graphisch wiedergegeben.

Eingestrahlte Intensität [mm³ Quanten/min]	Belichtungszeit [min]	Druckänderung in mm Brodie durch Licht: Großes Gefäß		Druckänderung in mm Brodie durch Licht: Kleines Gefäß		$\frac{1}{\varphi} = \frac{0{,}94 \cdot \mathcal{J} \cdot t}{X_{O_2}}$
Kompensationslicht allein	5	— 0,5		— 1,0		
Kompensationslicht + *Grün* $\mathcal{J} = 9{,}6$	15	+ 0,5	*+ 2,0*	+ 7,5	*+ 10,5*	X_{O_2} = + 32,5 mm³ O_2 X_{CO_2} = — 36,2 mm³ CO_2 γ = — 1,11 $1/\varphi$ = *4,10*
Kompensationslicht allein	10	— 1,0		— 2,0		
Kompensationslicht + *Grün* $\mathcal{J} = 18{,}8$	15	+ 1,5	*+ 3,0*	+ 11,5	*+ 14,5*	X_{O_2} = + 43,3 mm³ O_2 X_{CO_2} = — 47,0 mm³ CO_2 γ = — 1,085 $1/\varphi$ = *6,12*
Kompensationslicht allein	10	— 1,0		— 2,0		
Kompensationslicht + *Grün* $\mathcal{J} = 9{,}6$	30	+ 1,0	*+ 4,0*	+ 14,0	*+ 20,0*	X_{O_2} = + 60,4 mm³ O_2 X_{CO_2} = — 66,7 mm³ CO_2 γ = — 1,10 $1/\varphi$ = *4,42*
Kompensationslicht allein	10	— 1,0		— 2,0		
Kompensationslicht + *Grün* $\mathcal{J} = 4{,}86$	75	+ 2,0	*+ 9,5*	+ 22,0	*+ 37,0*	X_{O_2} = + 95,2 mm³ O_2 X_{CO_2} = — 96,0 mm³ CO_2 γ = — 1,015 $1/\varphi$ = *3,59*
Kompensationslicht allein	10	— 1,0		— 2,0		

Tab. 3. Messung des Quantenbedarfs für ein grünes Lichtinkrement. Je 200 mm³ Zellen: 7 cm³ Kulturlösung. Gasraum 10% CO_2-Luft. 20°. $\mathcal{J}$ = eingestrahlte Quantenintensität pro Minute. Absorbierter Bruchteil 93,9 Prozent.

Trägt man die nach Tab. 3 erhaltenen $1/\varphi$-Werte als Funktion der eingestrahlten Quantenintensität auf, so erhält man eine fast gerade Linie (Kurve in Einleitung), die bei $1/\varphi = 2{,}8$ die Ordinatenachse schneidet. Der Grenzwert von $1/\varphi$ für $J = 0$ ist also 2,8. Wie in der Einleitung erläutert, ist dies nahezu der energetisch mögliche Wert. Eine Korrektur für Chlorophyllabsorption war hier nicht anzubringen, da der Spektralbezirk des Inkrements nur vom Chlorophyll absorbiert wurde.

Im Rot (610—675 mμ) wurden die gleichen Ausbeuten erhalten.

Literatur

1 Warburg, O., Burk, Dean, Schocken, V., und Hendricks, St., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 4 (1950), 335; O. Warburg und Dean Burk, Arch. Biochemistry 25 (1950), 410.

2 Warburg, O., Burk, Dean, Schocken, V., und Hendricks, St., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 4 (1950), 335; O. Warburg und Dean Burk, Arch. Biochemistry 25 (1950), 410.

3 Burk, Dean, Hendricks, St., Korzenovsky, M., Schocken, V., und Warburg, O., „A Rediscovery." Science 110 (1949), 225.

4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.

5 Warburg, O., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 12b (1957), 716.

5a Warburg, O., und Schocken, V., Arch. Biochemistry 21 (1949), 2.

6a Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12.

6 Warburg, O., Schröder, W., und Gattung, H. W., Z. Naturforschg. 11b (1956), 654.

7 Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., Buchholz, W., und Theel, E., Z. Naturforschg. 9b (1954), 164; O. Warburg, G. Krippahl und W. Schröder, Z. Naturforschg. 9b (1954), 667; O. Warburg, G. Krippal und W. Schröder, Z. Naturforschg. 10b (1955), 631.

8 Ununterbrochene maximale Photosynthese würde bei nichtgrünen Zellen ununterbrochener maximaler Nahrungsaufnahme entsprechen.

9 Warburg, O., und Negelein, E., Z. physik. Chem. 106 (1923), 191.

10 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12; O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder und W. Buchholz, Z. Naturforschg. 9b (1954), 769; O. Warburg und W. Schröder, Z Naturforschg 10b (1955), 639; O. Warburg und W. Schröder, Z. Naturforschg. 12b (1957), 716; O. Warburg, G. Krippahl, H. S. Gewitz und W. Völker, Z. Naturforschg. 146 (1959), 712.

11 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230; vgl. auch O. Warburg und Mitarbb., Z. Naturforschg. 6b (1951), 285; 7b (1952), 141. Diese beiden Arbeiten sind nunmehr durch die räumliche Trennung aus Zellen und Carbonatgemischen überholt.

12 Emerson, R., und Lewis, C. M., Amer. J. Bot. 26 (1939), 808; 28 (1941), 789.

13 Franck, J., und Gaffron, H., Advances in Enzymol. 1 (1941), 199.

14 Warburg, O., Schröder, W., und Gattung, H. W., Z. Naturforschg. 11b (1956), 654.

15 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

16 Warburg, O., Krippahl, G., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 9b (1954), 667; 10b (1955), 631.

17 Warburg, O., und Schocken, V., Arch. Biochemistry 21 (1949), 2.

18 Warburg, O., und Negelein, E., Z. physik. Chem. 106 (1923), 191.

19 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12.

20 Warburg, O., Krippahl, G., Buchholz, W., und Schröder, W., Z. Naturforschg. 8b (1953), 675.

21 Warburg, O., Burk, Dean, Schocken, V., Koczenovsky, M., und Hendricks, St., Arch. Biochemistry 23 (1949), 2.

22 Warburg, O., und Krippahl G. Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

54 Glykolsäurebildung in *Chlorella**

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Unter geeigneten Bedingungen erhält man bei der Photosynthese von *Chlorella* eine dem Kohlensäureverbrauch äquivalente Menge an Glykolsäure.

Glykolsäurebildung bei der Photosynthese von *Chlorella* ergab sich zuerst aus assimilatorischen Quotienten, die vielfach den Wert 1,33 erreichten[1]. Später wurde diese Glykolsäurebildung durch analytischen Nachweis von Tolbert[2] bestätigt. Im folgenden wird gezeigt, daß bei der Photosynthese von *Chlorella* unter geeigneten Versuchsbedingungen die dem Kohlensäureverbrauch äquivalente Menge an Glykolsäure erscheint.

Das Ergebnis von Tolbert (l. c.), daß die Glykolsäurebildung Bicarbonat in der Außenflüssigkeit erfordert, können wir nicht bestätigen. Bei den meisten unserer Versuche war die *Chlorella* in saurem Phosphat (pH 4,3) suspendiert.

Die Herstellung definierter niedriger CO_2-Drucke

Dies war ein wesentliches Erfordernis dieser Arbeit. Wir benutzten dazu Carbonat-Bicarbonatgemische[4], die bei 20° die folgenden berechneten CO_2-Drucke ergaben:

$\frac{m}{5}$-$NaHCO_3$	$\frac{m}{5}$-Na_2CO_3	CO_2-Drucke in mm Brodie
15	85	0,28
25	75	0,88
50	50	5,24
75	25	23,0
85	15	49,0
95	5	173

Die Zellen wurden entweder in den Gemischen suspendiert, wobei sich dann die Zellen in einem unphysiologischen alkalischen Medium befanden, oder aber es wurden, unter Benutzung der neuen Wannengefäße[5], die Zellsuspensionen und Carbonatgemische räumlich getrennt. In die Wanne gaben wir die Zellen in ihrem normalen sauren Kulturmedium von pH 4,3, während die Carbonatgemische auf den Boden der Gefäße gegeben wurden und von hier aus im Gasraum und in den Zellen die gewünschten Kohlensäuredrucke erzeugten.

Bestimmung der Glykolsäure

Glykolsäure wurde kolorimetrisch mit 2.7-Dihydroxynaphthalin nach Eegriwe[6] bestimmt. 10 mg des Reagens wurden in 100 cm^3 reiner konzentrierter Schwefel-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960): 197.

säure jeden Tag frisch gelöst. Zu 0,2 cm³ der x-Lösung, die etwa 0,01 μMol Glykolsäure enthalten soll, wurden 3 cm³ des Reagens gegeben und damit 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, wobei eine rotviolette Färbung entstand, die im UV violett fluoresziert. Die Methode wurde kontrolliert durch Extraktion der Glykolsäure mit Äther nach CLAUSEN und Analyse des Calciumsalzes.

Bei den Versuchen mit *Chlorella* konnte die Glykolsäure im allgemeinen direkt in der Außenflüssigkeit nach Abzentrifugieren der *Chlorella* bestimmt werden, störende Verunreinigungen erkennt man an der unreinen Farbe und der Unreinheit des Fluoreszenzlichts. Dann mußte, z. B. wenn der *Chlorella*-Suspension Zucker zugesetzt war, die Glykolsäure zunächst im Clausen-Apparat extrahiert werden, nötigerweise nach Enteiweißung mit Metaphosphat.

Abhängigkeit der Glykolsäurebildung vom Kohlensäuredruck

In den Hauptraum von 4 kegelförmigen Wannengefäßen wurden je 3 cm³ Kalilauge oder Carbonatgemisch gegeben, in den Gasraum Sauerstoff, in die Wanne je 2 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 0,4 cm³ *m*/50-Phosphat pH 4,3. Nachdem bei 20° 800 mm³ Quanten pro Minute (weißes Licht) eingestrahlt worden waren, wurde aus dem Inhalt der Wannen die *Chlorella* herauszentrifugiert und im Überstand die Glykolsäure kolorimetrisch bestimmt, was trotz der eingesetzten sehr kleinen Zellmenge wegen der großen Empfindlichkeit der Glykolsäurereaktion gut möglich war.

Wir fanden:

Im Hauptraum	KOH	50 $\frac{m}{5}$-$NaHCO_3$ 50 $\frac{m}{5}$-Na_2CO_3	85 $\frac{m}{5}$-$NaHCO_3$ 15 $\frac{m}{5}$-Na_2CO_3	95 $\frac{m}{5}$-$NaHCO_3$ 5 $\frac{m}{5}$-Na_2CO_3
CO_2-Druck mm Brodie	fast Null	5,24	49,0	173
μMole Glykolsäure in 60 Minuten	0,05	0,15	0,08	0,005
O_2-Entwicklung in 60 Minuten, mm Brodie	—	+11,5	+21	+33

Abb. 1 ist eine graphische Darstellung des Versuchs. Das Maximum der Glykolsäurebildung liegt bei 5 mm Brodie und fällt nicht mit dem Maximum der O_2-Entwicklung zusammen. Bei einem Kohlensäuredruck von 173 mm Brodie werden nur noch Spuren von Glykolsäure gebildet.

Ausbeute an Glykolsäure

Wenn die Glykolsäure aus der im Licht reduzierten Kohlensäure entsteht, so kann maximal 1 Molekül Glykolsäure entstehen, wenn 2 Moleküle Kohlensäure im Licht verbraucht werden. Nach den Ergebnissen des vorigen Abschnitts kann diese maximale Ausbeute an Glykolsäure nur erwartet werden, wenn der Kohlensäuredruck so niedrig ist, daß er die Glykolsäurebildung noch nicht hemmt. Ein geeig-

neter Kohlensäuredruck war 5 mm Brodie, der durch $m/5$-Carbonat-Bicarbonatgemisch 50 + 50 erzeugt wird. In den Hauptraum eines Manometriegefäßes wurden 100 mm³ *Chlorella* gegeben, suspendiert in 3 cm³ des Gemischs 50 + 50.

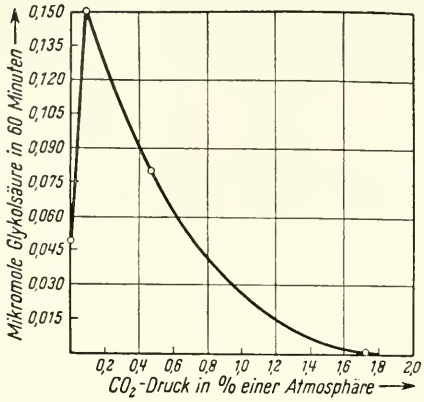


Abb. 1. Abhängigkeit der Glykolsäurebildung vom CO_2-Druck. Medium: $m/50$-KH_2PO_4, pH 4,3.

Der Gasraum enthielt reinen Sauerstoff, die Temperatur war 20°, die eingestrahlte Intensität an weißem Licht betrug 800 mm³ Quanten pro Minute. Nach 60 und 120 Minuten wurde der entwickelte Sauerstoff am Manometer abgelesen. Im Überstand der Zellen wurde die Glykolsäure bestimmt, x_{O_2} + (Glykolsäure/2) ergab den CO_2-Verbrauch x_{CO_2}. Wir fanden:

	nach 60 Min. [μMole]	nach 120 Min. [μMole]
O_2 entwickelt (x_{O_2})	12,6	23,5
Glykolsäure gebildet	9,0	18,0
CO_2 verbraucht (x_{CO_2})	$12{,}6 + \frac{9}{2} = 17{,}1$	$23{,}5 + \frac{18}{2} = 32{,}5$
$\frac{-CO_2}{+\text{Glykolsäure}}$	$\frac{17}{9} = 1{,}9$	$\frac{32{,}5}{18} = 1{,}8$

Im Mittel wurden also 1,85 μMole Kohlensäure verbraucht, wenn 1 Molekül Glykolsäure erschien. Die Ausbeute an Glykolsäure war also 92 % der Theorie.

Zeitliche Trennung von Reduktion der Kohlensäure und Bildung von Glykolsäure

Damit *Chlorella* Glykolsäure produziert, sind ein hoher Sauerstoffdruck, ein niedriger Kohlensäuredruck und intensive Belichtung notwendig, was durch den folgenden Versuch und seine graphische Darstellung in Abb. 2 anschaulich demonstriert wird.

In den Hauptraum von 4 Manometriegefäßen wurden 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ $m/50$-Phosphat pH 4,3, gegeben. Der Gasraum enthielt 2 Vol.-% CO_2 — O_2, was bei den Abmessungen der Gefäße ($v = \sim 18$ cm³) bedeutete, daß

jedes Gefäß etwa 15 μMole Kohlensäure enthielt. Die Temperatur war 20°. Eingestrahlt wurde weißes Licht der Intensität 800 mm³ Quanten pro Minute, das ist soviel, daß die Kohlensäure nach 15 Minuten verbraucht war, wie der Umschlag positiver in negative Druckänderungen zeigte. Wurde nun im Abstand von 15 Minuten je ein Gefäß herausgenommen und die Glykolsäure im Überstand der

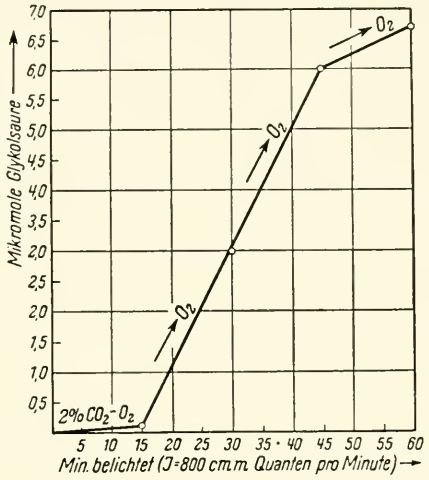


Abb. 2. Zeitliche Trennung von Kohlensäure-Reduktion und Glykolsäurebildung. $m/50$-KH_2PO_4, pH 4,3.

Zellen bestimmt, so wurde für die ersten 15 Minuten, wegen des Kohlensäuredrucks, fast keine Glykolsäurebildung gefunden. War aber die Kohlensäure verbraucht, so setzte eine starke Glykolsäurebildung ein, bis etwa für 2 Moleküle der verbrauchten Kohlensäure 1 Molekül Glykolsäure erschienen war; dann folgte eine langsame Glykolsäurebildung, wahrscheinlich aus der Atmungskohlensäure (Abb. 2).

Literatur

1 Warburg, O., und Burk, Dean, Arch. Biochemistry 25 (1950), 411.
2 Tolbert, N. E., J. biol. Chemistry 222 (1956), 895.
3 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. Naturforschg. 14b (1959), 712.
4 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.
5 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 14b (1959), 561.
6 Eegriwe, E., Z. analytische Chemie 89 (1932), 123, sowie Feigl, Fritz, SpotTests, Elsevier, Amsterdam 1954.

55 Über den chemischen Mechanismus der Photosynthese*

Von Otto Warburg, Günther Kkippahl, Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker**

O_2-Entwicklung im Licht durch Chinone in grünen Grana und in *Chlorella*, stöchiometrisch und katalytisch. Entstehung von H_2O_2 bei den Chinonkatalysen. Lichtphosphorylierung. Gleichungen der O_2-Entwicklung. Photosynthese.

Zu *Chlorella*[1], die seit 1920 das Hauptversuchsobjekt der Photosynthese gewesen ist, sind 1944 die grünen Grana[2] der Spinat- und Rübenblätter als Versuchsobjekte hinzugekommen. Alles Chlorophyll der grünen Zellen ist in den Grana konzentriert. Sie haben den weiteren Vorzug, daß sie, anders als *Chlorella*, für viele Salze durchlässig sind, z. B. für die Naphtochinonsulfosäuren und für die Adenosinphosphorsäuren. Zwar haben die isolierten Grana nicht mehr die Fähigkeit zur Photosynthese, aber setzt man ihnen Chinone[2] zu — Benzochinone oder Naphtochinone — so können sie im Licht ebenso schnell O_2 entwickeln wie intakte grüne Zellen. Die Reaktionsgleichung lautet:

$$2 \text{ Chinon} + 2\, H_2O = 2 \text{ Hydrochinon} + O_2, \qquad [1]$$

wobei die Grana in saurem Phosphat oder Bicarbonatpuffer suspendiert sind, unter Zusatz von wenig Chlorid, das hier die noch unaufgeklärte Rolle eines Kofaktors spielt.

Reaktion [1] ist in der Bilanz eine Zersetzung des Wassers durch Chinon. Es ist im vorigen Jahr gefunden worden[3], daß diese Zersetzung *nicht* vor sich gehen kann, wenn alle Kohlensäure aus den Versuchsobjekten entfernt wird. Der notwendige Halbwertdruck der Kohlensäure ist gleich etwa 10 mm Wasser. Bei einem Kohlensäuredruck von 1 mm Wasser ist eine O_2-Entwicklung durch Chinon kaum mehr nachweisbar. Dies war ein unerwartetes Resultat, da die Grana bei noch so hohen Kohlensäuredrucken in der Bilanz keine Kohlensäure verbrauchen. Kohlensäure muß also hier katalytisch wirken, das heißt, jede Reaktion, die sie eingeht, muß immer wieder rückgängig gemacht werden. Versucht man, diese katalytische Wirkung der Kohlensäure durch Zwischenreaktionen zu erklären, so ist vorauszuschicken, daß der O_2 sich aus einem Peroxyd entwickeln muß, welche Zwischenreaktionen man auch annehmen mag. Denn eine Entwicklung von atomarem Sauerstoff ist aus chemischen und energetischen Gründen auszuschließen. Chinon muß also hier ein Peroxyd erzeugen. Betrachtet man als Modell die technische Erzeugung der dimeren Perkohlensäure durch Dehydrierung, so sind die folgenden Zwischenreaktionen naheliegend:

---

* Zeitschrift für Naturforschung 14b (1959): 711.

** *Zusatz 1961.* Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist die Entdeckung, daß bei der photochemischen O_2-Entwicklung aus Grana oder Chlorella H_2O_2 entsteht, und zwar 2 Moleküle H_2O_2, wenn 1 Molekül O_2 entwickelt wird. Diese H_2O_2-Bildung, die die stöchiometrische Beteiligung eines Oxydans an der photochemischen O_2-Entwicklung beweist, wird ohne Zusatz eines Oxydans gefunden, aber nach Zusatz von Chinonen verstärkt gefunden.

$$\begin{array}{rcl} \text{Chinon} + CO_2 + 2\,H_2O & = & \text{Hydrochinon} + OHCOOOH \\ OHCOOOH & = & HCOOH + O_2 \\ \text{Chinon} + HCOOH & = & \text{Hydrochinon} + CO_2 \\ \hline \text{Bilanz: } 2\,\text{Chinon} + 2\,H_2O & = & 2\,\text{Hydrochinon} + O_2 \end{array}$$

Hier oxydiert also das Chinon die Kohlensäure zu einem monomeren Kohlensäureperoxyd, das dann unter Abspaltung von molekularem Sauerstoff zur Stufe der Ameisensäure reduziert wird. Die Stufe der Ameisensäure aber reagiert in statu nascendi mit Chinon zu Kohlensäure zurück und verschwindet damit aus der Bilanz.

Dabei müssen alle Zwischenprodukte mit dem Chlorophyll verbunden sein, da nur bei Bindung an das Chlorophyll gute Energieausbeuten möglich sind. Keinesfalls finden die Reaktionen in Lösung statt. Denn sie werden durch $n/1000$-Phenylurethan vollständig narkotisch gehemmt.

Eine Alternative wäre die Theorie, daß das Chinon nicht die Kohlensäure, sondern das Wasser oxydierte. Dann wäre das entstehende Peroxyd das Peroxyd des Wassers, also H_2O_2, und O_2 würde durch die Katalase aus dem Peroxyd des Wassers entwickelt:

$$\begin{array}{rcl} 2\,\text{Chinon} + 4\,H_2O & = & 2\,\text{Hydrochinon} + 2\,H_2O_2 \\ 2\,H_2O_2 & = & 2\,H_2O + O_2 \\ \hline \text{Bilanz: } 2\,\text{Chinon} + 2\,H_2O & = & 2\,\text{Hydrochinon} + O_2 \end{array}$$

Auch auf diesem Weg gelangt man also zu der im Experiment gefundenen Bilanz.

Für beide Alternativen gibt es Gründe und Gegengründe. Auf dem Weg über das Peroxyd der Kohlensäure würde die Kohlensäure bereits bei der Entwicklung des O_2 reduziert. Auf dem Weg über das Peroxyd des Wassers wäre die Reduktion der Kohlensäure eine sekundäre Dunkelreaktion. Der Weg über das Peroxyd der Kohlensäure ist also der einfachere und deshalb a priori der wahrscheinlichere. Er ist aus Versuchsgründen der wahrscheinlichere, weil die Chinonreaktionen, damit sie ablaufen können, einen Kohlensäuredruck benötigen. Gegen den Weg über das Peroxyd des Wassers spricht, daß die Katalase auf diesem Weg vorkommt, ein Ferment, das durch Blausäure gehemmt wird, während, wie wir vorausgreifend erwähnen möchten, die Entwicklung des O_2 bei den Chinonreaktionen durch Blausäure nicht gehemmt wird. — Eine Entscheidung dieser Alternative wäre von großer Bedeutung, wäre damit doch die Frage beantwortet, ob die Photosynthese eine Photolyse der Kohlensäure oder eine Photolyse des Wassers ist.

I. Katalysen des Chinons

Wenn bei den Chinonreaktionen das Chinon zu Hydrochinon reduziert und O_2 entwickelt wird, so erhält man die stöchiometrische Beziehung der Gl. [1], nach der 2 Moleküle Chinon 1 Molekül O_2 entwickeln. Bedingung dafür ist eine so saure Reaktion, daß O_2 und Hydrochinon nicht zurückreagieren. Wichtiger jedoch, wegen der Anwendungen auf die Photosynthese in lebenden Zellen, sind die Bedingungen, unter denen O_2 und Hydrochinon zurückreagieren, also Bedingungen, unter denen das Chinon katalytisch wirkt.

Um von den stöchiometrischen zu den katalytischen Chinonreaktionen überzugehen, hat man nur nötig, den pH-Wert der Medien, in denen die Grana suspendiert sind, von 6,5 auf 8 zu bringen. Dann folgt auf die Entwicklung des O_2 die Rückreaktion des O_2 und man erhält die Gleichungen:

$$\begin{array}{l} 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \\ 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O \\ \hline \text{Bilanz:}\quad 0 = 0 \end{array}$$

Nunmehr wird also alles, was geschieht, wieder rückgängig gemacht, auch das Chinon und der O_2 fallen aus der Bilanz heraus, und die Bilanz wird Null. Als man später fand, daß Phosphat in diesen Granasuspensionen gebunden wird, sah es zunächst so aus, als ob die Phosphatbindung das einzige sei, was chemisch im Licht geschah, ein Irrtum, dem der Name „Lichtphosphorylierung" seine Entstehung verdankt. In Wirklichkeit liegt hier nichts anderes vor als etwas, das man bei photochemischen Reaktionen sehr häufig findet: ein stationärer Zustand zwischen Hinreaktion und Rückreaktion, zwischen Lichtreaktion und Dunkelreaktion.

Untersucht man die Reoxydation des Hydrochinons näher, so zeigt sich, daß es zwei Arten von Reoxydation gibt; eine fermentative Reoxydation durch das Kupfer einer Phenoloxydase und eine direkte chemische Autoxydation. Beide Arten von Reoxydation unterscheiden sich wesentlich. Die fermentative Reoxydation bei der wahrscheinlich das notwendige Orthochinon die Dehydro-Chlorogensäure ist, also: $O_2 \rightarrow$Cu$\rightarrow$Chlorogensäure$\rightarrow$Hydrochinon [vgl. dazu Zitat 2], geht bereits bei niedrigen O_2-Drucken schnell vor sich, die Autoxydation geht schnell nur bei höheren O_2-Drucken vor sich. Die fermentative Reoxydation wird durch Blausäure gehemmt, die Autoxydation wird durch Blausäure nicht gehemmt. Bei der fermentativen Reoxydation bildet sich kein H_2O_2, bei der Autoxydation bildet sich quantitative H_2O_2 nach der Gleichung:

$$2\ \text{Hydrochinon} + 2\ O_2 = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O_2$$

II. Blausäure*

Von den beiden Reaktionen des O_2 im Verlauf der Chinonkatalysen, der Entwicklung des O_2 und der Rückreaktion des O_2, wird, wie erwähnt, die fermentative Rückreaktion des O_2 durch Blausäure gehemmt. Die Hinreaktion des O_2 jedoch wird merkwürdigerweise durch Blausäure nicht gehemmt. Dies kann man zeigen, indem man zu den stöchiometrischen Chinonreaktionen bei pH 6,5 Blausäure gibt, also unter Bedingungen, unter denen eine Rückreaktion des O_2 nicht stattfindet. Man findet dann, daß die O_2-Entwicklung durch $n/100$-Blausäure gar nicht, durch $n/10$-Blausäure nur wenig gehemmt wird.

Da nun zwar die Hinreaktion des O_2 durch Blausäure nicht gehemmt wird, da aber die fermentative Rückreaktion des O_2 durch Blausäure gehemmt wird, so wird die Chinon-Katalyse bei niedrigen O_2-Drucken immer durch Blausäure gehemmt werden. Steigert man aber den O_2-Druck so weit, daß die autoxydative Rückreaktion des O_2 schnell genug verläuft, so sind jetzt sowohl die Hinreaktion des O_2 als auch die Rückreaktion des O_2 ungehemmt, und man hat in $n/100$-Blau-

* Die Reaktion des Chinons mit Blausäure zu Dicyanhydrochinon verläuft so langsam, daß sie hier nicht störte.

säure die volle Chinonkatalyse. Der einzige Unterschied gegenüber der normalen Chinonkatalyse ist dann, daß bei der Rückreaktion des O_2 an Stelle des Wassers H_2O_2 entsteht, da Blausäure die Katalase der Grana hemmt. Die Gleichungen der Chinonkatalysen in $n/100$-Blausäure sind also:

$$\begin{array}{rcl} 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O & = & 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \\ 2\ \text{Hydrochinon} + 2\ O_2 & = & 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O_2 \\ \hline \text{Bilanz:}\ 2\ H_2O + O_2 & = & 2\ H_2O_2 \end{array}$$

Die Bilanz ist also nunmehr nicht mehr Null, sondern in der Bilanz wird O_2 verbraucht und es erscheint H_2O_2. Manometrisch wirkt sich dies so aus, daß bei Zusatz von Blausäure die Druckänderungen von Null in starke negative Druckänderungen umschlagen.

Man beachte, daß hier das Verhältnis H_2O_2/O_2 nicht gleich 1 ist, wie es bei einer einfachen Autoxydation sein sollte, sondern das Verhältnis H_2O_2/O_2 ist gleich 2. Man erhält also im Vergleich zum verbrauchten O_2 zuviel H_2O_2 und zwar 100% zuviel. Der Grund ist aus unsern Gleichungen ersichtlich: immer wenn 2 Moleküle O_2 in der Autoxydation verbraucht werden, wird 1 Molekül O_2 entgegenentwickelt.

Da das Verhältnis H_2O_2/O_2 bei unseren Anwendungen der Chinonkatalysen auf die Photosynthese eine Rolle spielen wird, habe ich die Versuche in einer Tabelle (Tab. 1) zusammengestellt, aus der hervorgeht, wie groß die Stoffumsätze sind und wie genau das Verhältnis H_2O_2/O_2 bestimmt werden kann.

Nr.	Puffer	Versuchszeit	O_2	H_2O_2	$\frac{H_2O_2}{O_2}$
	(pH 8,3)	(Min.)	(μMole)	(μMole)	
1	$n/100$-$NaHCO_3$-CO_2	20	— 6,2	+ 12,5	2,04
2	„	20	— 7,9	+ 17	2,16
3	$m/30$-Phosphat	50	— 7,2	+ 13	1,80
4	„	50	— 5,6	+ 11	1,96
5	Tris	35	— 6,7	+ 13	1,94
6	$n/100$-$NaHCO_3$-CO_2	35	— 8,2	+ 15,7	1,92
					Mittel 1,97

Tab. 1. O_2-Verbrauch und H_2O_2-Entwicklung in Grana (~ 1 μMol Chlorophyll) in Luft, in $n/100$-HCN, bei Zusatz von 0,5 bis 1 μMol Benzochinon oder β-Naphtochinonsulfosäure. pH 8,3. Eingestrahlter Energiestrom ~ 36 μMol Quanten pro Minute.

III. „Lichtphosphorylierung"

Setzt man den grünen Grana, die nach unseren Vorschriften von 1944 gewonnen und in Phosphatlösungen bei pH 8 suspendiert sind, Adenosindiphosphat zu und belichtet, so verschwindet, wie ARNON[4] gefunden hat, Phosphorsäure, und es erscheint Adenosintriphosphat.

Bei einer Untersuchung dieser „Lichtphosphorylierung" haben wir festgestellt, daß alles, was die Chinonkatalysen hemmt, auch die Lichtphosphorylierung hemmt. $n/10000$-Phenanthrolin hemmt die Chinonkatalysen und hemmt auch die Lichtphosphorylierung. $n/100$-Blausäure hemmt bei niedrigen O_2-Drucken die

Chinonkatalysen und hemmt auch die Lichtphosphorylierung. Aber $n/100$-Blausäure hemmt bei hohen O_2-Drucken die Chinonkatalysen *nicht* oder *wenig* und hemmt auch die Lichtphosphorylierung *nicht* oder *nur wenig*. Dieses sehr spezifische Verhalten gegenüber Blausäure in beiden Fällen beweist den Zusammenhang zwischen dem Ablauf der Chinonkatalysen und der Lichtphosphorylierung über allen Zweifel.

Es scheint fast ein Widerspruch zu sein, daß trotzdem die Bindung der Phosphorsäure an ADP keinen Einfluß auf die Chinonkatalysen hat. Tatsächlich ist die Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung durch Chinon die gleiche, ob man den Chinonkatalysen ADP zusetzt oder nicht, vorausgesetzt, daß freies Phosphat im Überschuß vorhanden ist. Die Erklärung ist, daß die Chinonreaktionen immer und unter allen Umständen Phosphat binden. Setzt man kein ADP zu, so wird das gebundene Phosphat bei der O_2-Entwicklung wieder frei, die Phosphorsäure bleibt in der Bilanz konstant und hat also die Funktion eines Katalysators. Setzt man ADP zu, so fängt das ADP das gebundene Phosphat ab und in der Bilanz wird Phosphorsäure verbraucht.

Wenn nun ADP, das bei den Chinonreaktionen gebundene Phosphat quantitativ abfängt, so kann man mit Hilfe von ADP messen, wieviel Phosphat bei den Chinonreaktionen gebunden wird. Um den dabei stattfindenden Chinonumsatz zu messen, schalten wir mit Blausäure auf die autoxydative Katalyse um und messen durch das H_2O_2 den Chinonumsatz bei der Phosphatbindung.

Wir fanden, daß 1 Molekül Phosphorsäure gebunden wird, wenn 1 Molekül H_2O_2 erscheint; oder anders ausgedrückt, daß 1 Molekül Phosphorsäure gebunden wird, wenn 1 Molekül Chinon 2 H-Atome aufnimmt. Dies ist dasselbe Verhältnis zwischen Phosphatbindung und Dehydrierung, das wir früher bei der Oxydationsreaktion[5] der Gärung gefunden haben, in dem bisher einzigen chemisch aufgeklärten Phosphorylierungs-Mechanismus. Die Energetik der Lichtphosphorylierung ist damit auf die Energetik der Dunkelphosphorylierungen zurückgeführt.

Welche Substanz aber ist es, die bei den Chinonreaktionen das Phosphat bindet? Die Antwort hängt davon ab, ob man bei den Chinonreaktionen denWeg über die Photolyse der Kohlensäure oder den Weg über die Photolyse des Wassers annimmt. Im ersten Fall wäre das Zwischenprodukt vielleicht ein phosphoryliertes Peroxyd der Kohlensäure, im zweiten Fall wäre es ein phosphoryliertes Wasserstoffperoxyd, eine Substanz, die man auch „Perphosphorsäure" nennen kann. Die Gleichungen für diese beiden Wege wären:

Weg über die Photolyse der Kohlensäure

$$\text{Chinon} + CO_2 + H_2O + H_3PO_4 = \text{Hydrochinon} + H_2PO_3 - O - COOOH$$
$$H_2PO_3 - O - COOOH + H_2O = H_3PO_4 + O_2 + HCOOH$$
$$\text{Chinon} + HCOOH = \text{Hydrochinon} + CO_2$$

Bilanz: $2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2$

Weg über die Photolyse des Wassers

$$2\ \text{Chinon} + 2\ H_3PO_4 + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + 2\ H_3PO_5$$
$$2\ H_3PO_5 = 2\ H_3PO_4 + O_2$$

Bilanz: $2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2$,

wo man vielleicht an Stelle von 2 H_3PO_5 die Per-Pyrophosphorsäure $H_4P_2O_9$ einsetzen könnte, da die beiden O-Atome aus *einem* Peroxydmolekül entwickelt werden müssen.

IV. Chlorella

Wir wollen uns nunmehr fragen, ob es Anhaltspunkte dafür gibt, daß die O_2-Entwicklung bei der Photosynthese chemisch verwandt ist mit der O_2-Entwicklung durch Chinon.

Zunächst ist hier an die von DAM[6] in grünen Zellen entdeckten Naphtochinone, an die K-Vitamine, zu erinnern: dann an die kürzlich von MORTON[7] und von O. WISS[8] und Mitarbeitern untersuchten Ubichinone, die Benzochinone sind; und nicht zuletzt an die Arbeiten von MARTIUS[9], nach denen Naphtochinone, gebunden an Protein, Fermente der oxydativen Phosphorylierung sind.

Auf der Suche nach einem entscheidenden Experiment haben wir die Grana verlassen und sind zu *Chlorella* als Versuchsobjekt übergegangen. Da nach unseren Erfahrungen die Chinonkatalysen der Grana am besten durch die H_2O_2-Bildung in Blausäure nachgewiesen werden können, prüften wir, ob *Chlorella*, *ohne* Zusatz von Chinon, unter den gleichen Bedingungen H_2O_2 ausscheidet.

Chlorella, *ohne* Zusatz von Chinon, wurde in kohlensäurehaltiger Luft belichtet, zunächst ohne Zusatz von Blausäure, wobei in der bekannten manometrischen Anordnung die normale Photosynthese die positiven Drucke erzeugte. Wurde dann Blausäure bis zu n/100 zugesetzt, so wurde die Photosynthese vollständig gehemmt und die Druckänderungen im Licht wurden Null. H_2O_2 erschien nicht. Wurde jedoch der O_2-Druck bei der Belichtung von $^1/_5$ Atmosphäre auf eine ganze Atmosphäre erhöht, so traten erhebliche negative Drucke auf, und es erschien in der Außenflüssigkeit H_2O_2. Im Dunkeln erschien kein H_2O_2, *n*/10000-Phenanthrolin hemmte die H_2O_2-Bildung vollständig. Wurde neben dem H_2O_2 auch der verbrauchte O_2 gemessen, so ergab sich das Verhältnis H_2O_2/O_2 nicht gleich 1, wie es bei einer einfachen Autoxydation sein müßte, sondern das Verhältnis H_2O_2/O_2 ergab sich gleich 2. Alles dies bedeutet, daß die für die Chinonkatalysen in Grana gefundenen Gleichungen auch für *Chlorella*, der *kein* Chinon zugesetzt ist, gelten, mit dem Unterschied, daß wir das Oxydans hier nicht Chinon nennen dürfen, da wir ja kein Chinon zugesetzt haben. Nennen wir das Oxydans F, um anzudeuten, daß es ein Ferment sein könnte, so lauten also die Gleichungen, auf *Chlorella* angewandt:

$$2\,F + 2\,H_2O = 2\,FH_2 + O_2$$
$$2\,FH_2 + 2\,O_2 = 2\,F + 2\,H_2O_2$$
$$\text{Bilanz:}\quad 2\,H_2O + O_2 = 2\,H_2O_2$$

Chlorella enthält also einen natürlichen Katalysator, der im Licht reduziert wird und dabei O_2 entwickelt; der in einer Dunkelreaktion immer wieder reoxydiert wird; und der sich in weiteren sehr speziellen Reaktionen ebenso verhält wie Chinon, das man zu Grana oder *Chlorella* zusetzt*.

* Es ist bemerkenswert, daß die Chinone *viel* schneller reagieren als die Pyridin- und Alloxazin-Nukleotide, die also keine Zwischenprodukte der Chinonreaktionen sein können. Sehr schnell reagiert Chinon mit Ascorbinsäure. Aber *dieser* Chinon-Anteil ist für die photochemische O_2-Entwicklung verloren.

Es soll dabei nicht vergessen werden, daß die Chinonreaktionen ihrerseits Metallkatalysen sind; daß die Hinreaktion des O_2 eine Katalyse durch das unbekannte Schwermetall ist, das durch $n/10000$-Phenanthrolin inaktiviert, aber durch $n/100$-Blausäure nicht inaktiviert wird; daß die fermentative Rückreaktion des O_2 eine Katalyse durch das Kupfer einer Phenoloxydase ist; während es noch zweifelhaft ist, ob ein drittes Schwermetall, das Eisen der in grünen Zellen und Grana sehr aktiven Katalase, bei den Chinonreaktionen eine Rolle spielt.

Wegen ihrer Bedeutung habe ich die Versuche in einer Tabelle zusammengestellt, in denen, nach Festlegung der optimalen Bedingungen, das Verhältnis H_2O_2/O_2 bestimmt worden ist. Wie man aus der Tab. 2 sieht, waren die Stoffumsätze so groß, daß das Verhältnis H_2O_2/O_2 mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden konnte.

Nr.		O_2 [μMole]	H_2O_2 [μMole]	$\frac{H_2O_2}{O_2}$
1		— 1,32	+ 2,40	1,82
2		— 1,26	+ 2,60	2,04
3		— 1,97	+ 4,95	2,50
4		— 2,04	+ 4,12	2,02
5		— 1,36	+ 2,72	2,00
6		— 2,14	+ 4,12	1,92
	Mittelwerte	— 1,68 = — 38 mm³ O_2	+ 3,48 = + 78 mm³ O_2	2,06

Tab. 2. O_2-Verbrauch und H_2O_2-Entwicklung in 100 mm³ *Chlorella* pro Stde., in $n/100$-HCN, in 20 Vol.-% CO_2—O_2. pH 4. Eingestrahlter Energiestrom 36 μMole Quanten pro Minute.

V. Photosynthese

Es bleibt noch das Problem, die Verbindung herzustellen von der O_2-Entwicklung im Licht zu dem Vorgang, welcher der Sinn der Photosynthese ist, zur Fixierung des Kohlenstoffs. Bei keinem der Versuche, die wir beschrieben haben, ist Kohlenstoff fixiert worden. War dies ein zufälliges Resultat oder hatte es eine innere Ursache?

Zur Beantwortung dieser Frage haben wir eine Methode entwickelt[10], mit der Änderungen des Partialdrucks der Kohlensäure in einem Manometriegefäß genauer als bisher bestimmt werden können (Abb. 1). Es befand sich im Hauptraum die Grana- oder Zellsuspension, in Birne I überschüssige Schwefelsäure, in der Wanne Kaliumpermanganat, in der mit der Wanne verbundenen Birne Kaliumferrocyanid, im Gasraum 2 Vol.-% Kohlensäure in Argon oder Sauerstoff.

Gibt man Schwefelsäure in den Hauptraum, so wird Kohlensäure aus etwa vorhandenem Bicarbonat in Freiheit gesetzt. Gibt man das Ferrocyanid in das Kaliumpermanganat, so wird die vorher neutrale Reaktion in der Wanne alkalisch und die im Gefäß befindliche Kohlensäure wird schnell absorbiert. So erhält man den Partialdruck der gesamten Kohlensäure im Manometriegefäß zu den Zeiten t_0 und t, und jede Abnahme dieses Partialdrucks im Licht würde Fixierung des Kohlenstoffs bedeuten. Trotz vieler Variationen fanden wir, daß die O_2-Entwicklung im Licht durch Chinon in keinem Fall von einer Änderung des Partialdrucks der Kohlensäure begleitet war.

Die Ursache der Nichtfixierung ist nichts anderes als das Fehlen der Atmung. Grana atmen *nicht* und fixieren *nicht*. *Chlorella*, der Chinon zugesetzt ist, atmet *nicht* und fixiert *nicht*. *Chlorella* nach Behandlung mit $n/100$-Blausäure im Dunkeln atmet und fixiert, aber *Chlorella* nach Behandlung mit $n/100$-Blausäure im

Abb. 1.
Manometriegefäß zur Bestimmung des Kohlensäure-Partialdrucks.

Licht, atmet *nicht* und fixiert *nicht*. Sie atmet *nicht*, weil im Licht H_2O_2 entsteht, das die Atmung vernichtet.

Durch sehr viele derartige Versuche ist die Regel* „Keine Fixierung ohne Atmung" gefunden worden. Zwar kann man unsere Gleichungen der Kohlensäure-Photolyse leicht so ändern, daß Kohlenstoff fixiert wird, einfach, indem man die Peroxydbildung durch Chinon auf der Ameisenstufe sich wiederholen läßt. Aber dann kommt man mit der fundamentalsten Tatsache der Photosynthese in Konflikt, daß 1 Lichtquantum 1 Molekül O_2 entwickelt; und erst wenn man die lichtinduzierte Atmung hinzuschreibt und ihre Energie für die 1 Quantenreaktion ausnutzt, wird die Fixierung energetisch möglich.

So wächst unablässig die Evidenz, daß die Atmung zum chemischen Mechanismus der Photosynthese gehört. Die Entdeckung der lichtinduzierten Atmung durch Dean Burk und Warburg im Jahr 1950 hier in Dahlem war das erste und

* Versuche, in denen wir (vgl. diese Z. 13b, 509 [1958]) Fixierung ohne Atmung zu finden glaubten, haben sich bisher immer als irrtümlich erwiesen.

wichtigste Experiment[11]. Es folgte 1958 die Arbeit von KRIPPAHL[12], nach der im Gebiet sehr niedriger O_2-Drucke die Atmung und die Photosynthese in gleichem Maße absinken. Es folgte 1959 eine Arbeit von KAYSER[13], nach der in den grünen Keimblättern der Gerste, in denen die Kohlenoxydhemmung im Lauf von 14 Tagen verschwindet, in jeder Phase des Verschwindens Atmung und Photosynthese um den gleichen Betrag gehemmt werden. Es folgt heute die Hemmung der Fixierung des Kohlenstoffs durch atmungshemmende Dosen von Chinon; und — besonders beweisend — die Fixierung oder Nichtfixierung des Kohlenstoffs je nach Vorbehandlung der *Chlorella* mit *n*/100-Blausäure: Fixierung nach Vorbehandlung mit Blausäure im Dunkeln, wobei die Atmung intakt bleibt; und Nichtfixierung nach 1stündiger Vorbehandlung der Chlorella mit Blausäure im Licht, wobei die Atmung vernichtet wird.

Versuchsteil

Als Versuchsobjekte wurden Grana oder „Broken Chloroplasts" oder *Chlorella* benutzt.

Grana. Die Grana wurden aus Blättern von Freilandspinat nach den Vorschriften von 1944 gewonnen[2], und unter Zusatz von Cl-Ionen, die hier die Funktion eines Kofaktors haben, belichtet. Die Suspensionsmedien waren entweder *m*/30-Phosphat oder *m*/10-Bicarbonat mit Kohlensäure im Gasraum; pH wurde von 4,3 bis 8 variiert. Sollte auch die Lichtphosphorylierung untersucht werden, so wurden ADP und $MgCl_2$ zugesetzt. Oxydantien waren wie 1944 Benzochinon, β-Naphtochinonsulfosäure und Ferricyanid. Wegen ihrer Fähigkeit zur Autoxydation sind die Chinone die physiologisch interessanteren Oxydantien.

Wir unterscheiden stöchiometrische und katalytische Versuche. Bei den stöchiometrischen Versuchen mit Grana war pH etwa 6,7, ein pH, bei dem der O_2 die Hydrochinone nicht reoxydiert. 2 Moleküle Chinon entwickelten dann 1 Molekül Sauerstoff. Bei den katalytischen Versuchen mit Grana war pH etwa 8, ein pH, bei dem der O_2 die Hydrochinone reoxydiert. Bei den katalytischen Versuchen war die zugesetzte Chinonmenge etwa 1 μMol Chinon pro μMol Grana-Chlorophyll. Bei den stöchiometrischen Versuchen war die zugesetzte Menge Chinon 10 bis 20 μMole Chinon pro μMol Grana-Chlorophyll.

Die stöchiometrische Versuchsanordnung ist die einfachere, weil man es hierbei nur mit der Entwicklung des O_2, mit der Hinreaktion der Katalyse zu tun hat. Die verschiedenartigsten Grana geben dabei schnelle O_2-Entwicklungen, z. B. Grana aus Freilandspinat, aus Neuseeländer Gewächshausspinat, aus Mangold, Zuckerrüben, Futterrüben, Kohlrabi, Salat und so weiter.

Komplizierter ist die katalytische Versuchsanordnung, weil hier zu der Hinreaktion die Rückreaktion des O_2 hinzukommt. Noch komplizierter ist die Versuchsanordnung mit Phosphorylierung, weil hier zu den Chinonreaktionen die Transphosphorylierungs-Reaktionen hinzukommen. In der Tat kann Phosphorylierung nur gefunden werden, wenn die Transphosphorylasen nicht aus den Grana ausgewaschen sind, während diejenigen Fermente, die das Adenosintriphosphat spalten, entfernt sein müssen. So kommt es, daß viele Granaarten, die zur Untersuchung der Chinonreaktionen geeignet sind, zur Untersuchung der Phosphorylierung ungeeignet sind. Allen Anforderungen genügten die Grana aus Freilandspinat, also diejenigen Grana, die 1944 bei der Entdeckung der Granareaktionen die Versuchsobjekte gewesen sind. Neuere Vorschriften zur Gewinnung dieser Grana und die komplizierten Medien, die zur Untersuchung der Lichtphosphorylierung empfohlen wurden, sind nach unseren Erfahrungen keine Verbesserungen, sondern eher Verschlechterungen gegenüber 1944.

„Broken Chloroplasts". Fraktioniert man nach unseren Vorschriften die Granasuspensionen auf der Zentrifuge, so werden die schwereren Fraktionen neuerdings als „Broken Chloroplasts" bezeichnet. In diesen Fraktionen ist das Ferment der Rückreaktion des Hydrochinons, die Phenoloxydase, wirksamer als in den leichteren Fraktionen. Die Folge davon ist, daß zur Reoxydation des Hydrochinons ein niedrigerer O_2-Druck genügt, so daß man bei der Manometrie in Argon und in Luft die gleiche Lichtphosphorylierung findet; während die leichteren Granafraktionen in Argon schlechter

phosphorylieren als in Luft. Die Folge davon ist, daß die schweren und leichten Grana-Fraktionen sich in Blausäure bei Variationen des O_2-Drucks etwas verschieden verhalten.

Chlorella. Chlorella hat als Objekt zur Untersuchung der Chinonreaktionen den Nachteil, daß sie impermeabel für viele Salze ist, z. B. für Naphtochinonsulfosäuren und für die Adenosinphosphate. Da auch die Atmung der *Chlorella* hier eine Komplikation ist, so sind die nicht atmenden Grana als Versuchsobjekte vielfach vorzuziehen.

Sind aber Versuche mit *Chlorella* aus irgendeinem Grund notwendig, so muß man wissen, daß ihre Atmung labil gegen oxydierende Substanzen ist, z. B. gegen Chinon, das in sehr kleinen Konzentrationen die Atmung der *Chlorella* irreversibel hemmt; z. B. gegen H_2O_2, das in sehr kleinen Konzentrationen die Atmung der *Chlorella* hemmt, falls die Katalase durch Blausäure vergiftet ist. Die Folge davon ist, daß Blausäure im Licht die Atmung der *Chlorella* zerstört, während Blausäure im Dunkeln die Atmung der *Chlorella* intakt läßt. Dunkelkontrollen bei Versuchen mit Blausäure können also irreführen. Sie haben uns vor vielen Jahren irregeführt[14], als wir zu finden glaubten, daß Blausäure die Photosynthese nur oberhalb des Kompensationspunktes hemmt. In Wirklichkeit hemmt Blausäure die Photosynthese in gleichem Maße auf beiden Seiten des Kompensationspunktes, was heute selbstverständlich ist. Denn heute weiß man[14a], daß die Atmung durch nichts anderes kompensiert wird als durch die Reaktion $CO_2 = C + O_2$.

Manometrie. Wegen der Carotinoid-Oxydase[15] sollten die manometrischen Versuche in Luft oder O_2 nach Möglichkeit unter Zusatz von Kohlensäure ausgeführt werden und im allgemeinen nicht länger als eine Stde. dauern. Mehrfach haben wir nach beendeter Manometrie die Pigmente der Grana oder *Chlorella* mit Methanol extrahiert und die Spektren der Methanolextrakte registriert. Keine wesentlichen Änderungen der Spektren in den Versuchszeiten wurden gefunden.

Bei den manometrischen Versuchen mit Blausäure ist darauf zu achten, daß beim Durchleiten der Gase durch die Manometriegefäße keine Blausäure verloren wird. Es wird empfohlen, Manometriegefäße mit 2 Birnen zu benutzen. In die erste Birne werden 0,4 cm^3 der Blausäurelösung gegeben, durch die zweite Birne strömen die Gase während der Gasdurchleitung aus. Erst nachdem die Gasdurchleitung beendet ist und die Hähne geschlossen sind, wird die Blausäure aus der Birne in den Hauptraum gegeben. Man überzeugt sich durch Titration der Blausäure mit Silbernitrat im Hauptraum, daß bei dieser Anordnung keine nennenswerten Mengen an Blausäure verloren werden.

Die Temperatur bei der Manometrie war 20^0. Die Lichtstrahlen wurden von 500-Watt-Metallfadenlampen (Kinolampen) erzeugt und mit verdünntem Kupfersulfat von Ultrarot nahezu befreit. Der pro Gefäß eingestrahlte Energiestrom betrug 36 μMole Quanten pro Min. und wurde von dem Chlorophyll, dessen Menge 0,75 bis 1,5 mg pro Gefäß betrug, zum größeren Teil absorbiert.

War bei den manometrischen Versuchen Adenosindiphosphat zugesetzt und enthielt der Gasraum Kohlensäure, so wurde bei der Phosphatbindung Kohlensäure absorbiert, da die Reaktion bei der Phosphatbindung alkalischer wird. Will man dabei den O_2-Umsatz bestimmen, so muß die Kohlensäureaufnahme durch Einkippen von überschüssiger Säure gemessen und bei der Berechnung des O_2-Umsatzes berücksichtigt werden. Um dieses etwas umständliche Verfahren zu vermeiden, wird man im allgemeinen, wenn ADP zugesetzt ist, Phosphatpuffer als Suspensionsflüssigkeit verwenden. Allerdings ist dann die Phosphatbindung gegenüber Bicarbonat-Kohlensäure-Puffer verlangsamt.

Die manometrische Bestimmung der Fixierung des Kohlenstoffs ist im Text beschrieben. Diese Methode ist dem nur qualitativen Nachweis der Fixierung mit Hilfe von radioaktiver Kohlensäure bei weitem vorzuziehen.

Bestimmung der Phosphatbindung. Zur Messung der Phosphatbindung wurde das anorganische Phosphat zu den Zeiten t_0 und t im Perchlorsäureextrakt der Grana mit Ammonmolybdat und Ferrosulfat nach SUMNER[16] bestimmt. Nur wenn der Phosphatpuffer konzentriert war, wurde das anorganische Phosphat mit $MgCl_2$ in alkalischer Lösung ausgefällt und im Filtrat die Zunahme des ATP bestimmt.

Bestimmung des H_2O_2. Die beste Bestimmung des H_2O_2 ist die manometrische. Die Granasuspensionen werden zu dem Zweck mit Perchlorsäure gefällt, aus dem Perchlorsäure-Extrakt wird die Blausäure ausgetrieben. Dann wird bis pH 6 neutralisiert und nach Zusatz von Katalase der O_2 entwickelt.

Sollte das H_2O_2 kolorimetrisch bestimmt werden, so wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt und zum Filtrat Titandioxyd zugesetzt, falls die Flüssigkeiten nicht zuviel Phosphorsäure enthielten. Andernfalls wurde eine neue Farbreaktion angewendet, bei der 2.7-Dihydroxynaphtalin in konzentrierter Schwefelsäure eine Blaufärbung erzeugt. Hierbei stört weder Phosphorsäure noch Blausäure, aber z. B. Glykolsäure und Milchsäure. Zur Ausführung löst man 10 mg 2.7-Dihydroxynaphtalin in 100 cm^3 reinster konz. Schwefelsäure, gibt 3 cm^3 davon zu 0,2 cm^3 einer wäßrigen x-Lösung und erwärmt 10 Min. im siedenden Wasserbad.

Versuche

Versuch vom 30. 6. 59. Grana von Freilandspinat, nach der Vorschrift von 1944 gewonnen und in *m*/30-Phosphat pH 6,7 suspendiert. *Die stöchiometrische O_2-Entwicklung im Licht wird durch n/100 Blausäure nicht gehemmt.*

	Gefäß 297 k_{O_2} = 1,41 mm². *in n/100-Blausäure*	Gefäß 302 k_{O_2} = 1,37 mm². *ohne Blausäure*
Hauptraum:	[cm³] 1,0 *m*/10-Phosphat pH 6,5 1,0 Grana = 0,79 μMole Chlorophyll 1,4 H_2O 0,1 *m*/2-KCl 0,4 *n*/10-HCN	 → → → → 0,4 H_2O
Birne:	12 μMole β-Naphtochinon-sulfosäure in 0,1 H_2O	→
Gasraum:	1,7% CO_2-Argon	→

[Min.]	hell O_2 [mm³]	hell O_2 [mm³]
10	+ 83	+ 93
10	+ 44	+ 37
5	0	0
25	+127	+130
	= 5,7 μMole O_2	= 5,8 μMole O_2
	ber. 6,0 μMole O_2	ber. 6,0 μMole O_2

Nichthemmung der stöchiometrischen O_2-Entwicklung findet man auch, wenn man die β-Naphtochinonsulfosäure durch Benzochinon ersetzt.

Versuch vom 15. 7. 59. *Grana* von Freilandspinat, nach Vorschrift von 1944, suspendiert in *m*/12-Phosphat pH 7,4, ± HCN belichtet. *Die stöchiometrische O_2-Entwicklung durch Ferricyanid wird von n/100-HCN nicht gehemmt.*

	Gefäß I k_{O_2} = 1,604 mm² *ohne HCN*	Gefäß II k_{O_2} = 1,665 mm² *n*/100-HCN
Hauptraum:	2,5 cm³ *m*/10-Phosphat pH 7,4, 0,1% KCl 0,5 cm³ Grana = 1,8μ Mole Chlorophyll	→
Birne I:	0,2 *m*/5 $K_3Fe(CN)_6$ = 40 μMole	→
Birne II:	—	0,3 *n*/10-HCN
Gasraum:	Argon	→

[Min.]	hell [mm]	hell [mm]
5	+ 21	+ 18
5	+ 14,5	+ 15,5
5	+ 12,0	+ 11,0
15	+ 28	+ 26
15	+ 21	+ 20,5
15	+ 15	+ 15,5
60	+111,5	+106,5
	= 179 mm³ O_2	= 177 mm³ O_2

Versuch vom 30. 6. 59. *Grana* von Freilandspinat, nach der Vorschrift von 1944 gewonnen, in *m*/40-Phosphat pH 8,3 suspendiert, verbrauchen O_2 bei Belichtung in *n*/100-HCN und bilden H_2O_2. Das Verhältnis H_2O_2/O_2 ist ungefähr = 2.

	Gefäß I k_{O_2} = 1,41 mm² *n/100-HCN*	Gefäß II k_{O_2} = 1,37 mm² *ohne HCN*
Hauptraum:	[cm³] 1,0 *m*/10-Phosphat pH 8,3 0,1 *m*/2,KCl 1,0 Grana = 0,79 μMol Chlorophyll 1,4 H_2O 0,4 *n*/10-HCN	→ aber ohne HCN
Birne:	1 μMol β-Naphtochinon-sulfosäure in 0,1 H_2O	→
Gasraum:	Luft	→
[Min.]	hell [mm]	hell
5	— 10,5	
5	— 25	
5	— 19	
5	— 13	
10	— 24	
10	— 13	
10	— 9	
50	— 113,5	+ 1 mm
	= — 160 mm³ O_2 = — 7,2 μMole O_2	
H_2O_2 gebildet	+ 13,1 μMole	*kein* H_2O_2
+ H_2O_2 — O_2	= — 1,82	

Versuch vom 1. 6. 59. *Grana* („Broken Chloroplasts") von Freilandspinat, suspendiert in *n*/10-$NaHCO_3$, Gasraum, 2 Vol-% CO_2-Argon, pH 8,3; belichtet ± HCN. Der niedrige O_2-Druck, der im Licht entsteht, genügt zur Reoxydation der katalytischen Chinonmenge, wenn keine HCN zugegen ist. In HCN jedoch ist die fermentative Reoxydation gehemmt und damit auch die Lichtphosphorylierung.

	Gefäß I Volumen 18,92 cm³ ohne HCN (pH 8,3) hell	Gefäß II Volumen 18,52 cm³ *n*/270-HCN (pH 8,3) hell
Hauptraum:	[cm³] 2,0 *m*/5-$NaHCO_3$ = 400 μM 0,3 *m*/10-K_2HPO_4 = 30 μM 0,1 *m*/10-$MgCl_2$ 0,4 *m*/20 ADP 1,0 Grana = 1 μMol Chlorophyll	→ aber 0,15 cm³ *n*/10-KCN
Birne:	0,5 μMol β-Naphtochinon-sulfosäure in 0,2 H_2O	→
Gasraum:	2 Vol.-% CO_2-Argon 25 Min. — 49 mm (ist CO_2-Absorption infolge Phosphorylierung)	→ — 5 mm (wenig Druck, da wenig Phosphorylierung)
μMole ATP	12,8	0,75

Versuch vom 1. 7. 59. *Grana* von Freilandspinat, nach Vorschrift von 1944 gewonnen, suspendiert in *m*/10-$NaHCO_3$, Gasraum 2 Vol-% CO_2 mit Luft oder Argon. pH 8,3. *Wirkung des O_2-Drucks und der Blausäure auf die Lichtphosphorylierung.* In 2% CO_2-Luft steht für die Reoxydation des Hydrochinons der O_2-Druck der Luft zur Verfügung, in 2% CO_2-Argon steht nur der im Licht entwickelte O_2 zur Verfügung. In CO_2-Argon ist also der O_2-Druck sehr niedrig. Im Licht war:

	Gefäß I — HCN	Gefäß II + HCN	Gefäß III — HCN	Gefäß IV + HCN
	Hoher O_2-Druck	→	Niedriger O_2-Druck	→
Hauptraum:	[cm³] 2,0 *m*/5-$NaHCO_3$ = 400 μM 0,1 *m*/10-$MgCl_2$ 0,3 *m*/10-K_2HPO_4 = 30 μM 0,4 *m*/20-ADP 1,0 Grana = 0,9 μMol Chlorophyll	→	→	→
Birne:	0,4 H_2O	0,4 *n*/10-HCN	0,4 H_2O	0,4 *n*/10-HCN
Gasraum:	2 Vol.-% CO_2-Luft	2 Vol.-% CO_2-Luft	2 Vol.-% CO_2-Argon	2 Vol.-% CO_2-Argon
ADP gebildet nach 30 Min. Belichtung	16,3 μMole	7,4 μMole	6,5 μMole	0 μMole

Versuch vom 8. 7. 59. *Grana* von Freilandspinat, nach der Vorschrift von 1944 gewonnen und in Bicarbonatpuffer suspendiert, sind *das beste Versuchsmaterial zum Nachweis und zur Messung der Lichtphosphorylierung.* In dem folgenden Versuch bindet eine Granamenge, die 1,5 μMole Chlorophyll enthält, in 15 Min. 20 μMole H_3PO_4. Die Halbwertzeit beträgt etwa 3 Minuten. Katalysator ist β-Naphtochinonsulfosäure. Im stöchiometrischen Versuch mit β-Naphtochinonsulfosäure erscheint in 15 Min. die berechnete Menge O_2, die Halbwertzeit ist etwa 14 Minuten. Im Licht war:

	Stöchiometrischer Versuch pH 6,8		*Katalytischer Versuch* pH 8,0
Hauptraum:	[cm³] 1,0 *m*/10-Phosphat 0,1 *m*/2-KCl 0,5 Grana = 1,5 μMole Chlorophyll 2,4 H_2O	Hauptraum:	[cm³] 2,0 *m*/5-$NaHCO_3$ = 400 μM 0,1 *m*/2-KCl 0,1 *m*/10-$MgCl_2$ 0,3 *m*/10-Na_2HPO_4 = 30 μM 0,4 *m*/20-ADP = 20 μM 0,5 Grana = 1,5 μMole Chlorophyll 0,4 H_2O
Birne:	10 μMole β-Naphtochinonsulfosäure	Birne:	1 μMol β-Naphtochinonsulfosäure
Gasraum:	Argon	Gasraum:	2 Vol.-% CO_2-Luft

[Min.]	hell [O_2 mm³]
5	+ 60,6
5	+ 42,3
5	+ 9,9
5	+ 1,4
20	+ 114,2

= 5,1 μMole O_2 berechnet 5,0 μMole O_2

[Min.]	hell [mm]	dunkel [mm]
5	— 59	+ 1
5	— 44	+ 4
5	— 5	+ 4
5	— 1	+ 4

↓ Ist CO_2-Absorption durch Phosphatbindung ↓ ATP gebildet 17,4 μMole

↓ ATP gebildet 0 μM

Versuch vom 29. 5. 59. *Grana* („Broken Chloroplasts") von Freilandspinat, suspendiert in *m*/10-$NaHCO_3$, Gasraum 2 Vol.-% CO_2-Luft, pH 8,3, zeigen mit ADP sehr erhebliche *Lichtphosphorylierung. Wird durch n/200-HCN nicht gehemmt.* Aus den Drucken kann der O_2-Verbrauch nicht berechnet werden, da CO_2 infolge der Phosphorylierung, absorbiert wird Bestimmung von ATP und von H_2O_2.

	Gefäß I (v = 18,92 cm³) *ohne HCN*	Gefäß II (v = 18,5 cm³) *n*/1000-*HCN*	Gefäß III (v = 18,78 cm³) *n*/*200-HCN*
Hauptraum:	[cm³] 2,0 *m*/5-$NaHCO_3$, 0,3 *m*/10-K_2HPO_4, 0,1 *m*/10-$MgCl_2$, 0,4 *m*/20-ADP, 1,0 Grana = 0,5 μMole Chlorophyll	→ + 0,04 cm³ *n*/10-HCN	→ + 0,2 cm³ *n*/10-HCN
Birne:	0,5 μMole β-Naphtochinonsulfosäure in 0,2 H_2O	→	→
Gasraum:	2% CO_2-Luft	→	→

[Min.]	hell [mm]	hell [mm]	hell [mm]
5	— 26	— 54	— 52
5	— 18	— 45	— 47
10	— 21	— 32	— 41
	↓ + 0,3 cm³ 30proz. $HClO_4$ H_3PO_4	→	→
	gebunden als ATP 13,5 μMole	→ ↓ 13,0 μMole	→ ↓ 12,2 μMole

Also keine Hemmung der Lichtphosphorylierung durch HCN.

Versuch vom 29. 5. 59. *Grana* („Broken Chloroplasts") von Freilandspinat suspendiert in $n/10$-$NaHCO_3$, Gasraum 2 CO_2-Luft, pH 8,3, in $n/500$-HCN. *Vergleich von Phosphorylierung und H_2O_2-Bildung.*

	Gefäß I Vol. 18,92 cm³ *ohne HCN* *hell*	Gefäß II Vol. 18,52 cm³ $n/500$-HCN *hell*	Gefäß III Vol. 18,78 cm³ $n/500$-HCN *dunkel*
Hauptraum:	[cm³] 2,0 $m/5$-$NaHCO_3$ 0,3 $m/10$-K_2HPO_4 0,1 $m/10$-$MgCl_2$ 0,4 $m/20$-ADP 1,0 Grana = 0,5 μMol Chlorophyll	→ aber +0,1 cm³ $n/10$-HCN	→ aber +0,1 cm³ $n/10$-HCN
Birne:	0,5 μMol β-Naphtochinonsulfonsäure in 0,2 cm³ H_2O	→	→
Gasraum:	2 Vol.-% CO_2-Luft	→	→
	25 Min. —73 mm	—165 mm	+4 mm
	μMole ATP 14,4	13,0	0
	μMole H_2O_2 0	13,5	0
		↓	
		$\frac{H_2O_2}{ATP} = 1$	

Dieser Quotient kann nur gefunden werden, solange ADP im Überschuß vorhanden ist, also in kurzen Versuchen.

Versuch vom 13. 7. 59, *Grana* von Freilandspinat, nach der Vorschrift von 1944 gewonnen und in $m/30$-Phosphat pH 8,3 suspendiert. *Die stöchiometrische O_2-Entwicklung durch β-Naphtochinonsulfosäure im Licht wird durch Zusatz von ADP nicht beeinflußt.* In diesem Versuch ist die Phenoloxydase durch die große Menge Chinon vergiftet, daher bei sehr niedrigen O_2-Drucken keine Reoxydation.

	Gefäß 297 k_{O_2} = 1,50 mm² +ADP	Gefäß 302 k_{O_2} = 1,47 mm² ohne ADP
Hauptraum:	[cm³] 1,0 $m/10$-Na_2HPO_4 0,1 $m/10$-$MgSO_4$ 0,1 $m/2$-KCl 0,4 $m/20$-ADP 0,2 Grana = 0,64 μMol Chlorophyll 1,0 H_2O	→ → → 0,4 H_2O — →
Birne:	10 μMole β-Naphtochinonsulfosäure in 0,2 H_2O	→
Gasraum:	Argon	→

[Min.]	hell [mm]	hell [mm]
2	+16,5	+10,0
2	+ 8,0	+ 8,0
3	+ 6,0	+10,0
3	+ 7,0	+ 9,0
5	+11,0	+12,0
5	+ 7,0	+ 7,0
5	0	+ 0,5
25	+55,5	+56,5
	= 83 mm³ O_2	= 83 mm³ O_2

Entwickelt man unter sonst gleichen Bedingungen den O_2 mit 40 μMolen Ferricyanid ± ADP, so findet man auch dann keinen Einfluß von ADP auf die Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung. Entgegengesetzte Angaben der Literatur beruhen darauf, daß durch den Zusatz des ADP die Acidität verschoben worden ist.

Versuch vom 24. 5. 59. *Chlorella* (2tägige Südfenster-Kultur), suspendiert in $m/50$-KH_2PO_4 + $m/50$-$MgSO_4$, pH 4,3, *im Dunkeln* + *H_2O_2 oder* + *HCN oder* + *H_2O_2* + *HCN*.

	Gefäß I k_{O_2} = 1,86 mm² *nur H_2O_2*		Gefäß II k_{O_2} = 1,70 mm² *nur HCN*	Gefäß III k_{O_2} = 1,840 mm² *H_2O_2 + HCN*	
Hauptraum:	100 mm³ *Chlorella* in 3 cm³ $m/50$-KH_2PO_4 $m/50$-$MgSO_4$		→	→	
	—		+ 0,3 $n/10$-HCN	+ 0,3 $n/10$-HCN	
Birne:	10 μMole H_2O_2		—	→	
Gasraum:	20 Vol.-% CO_2—O_2 dunkel und Birne eingekippt		—	→	
[Min.]	[mm]				
5	+ 52,5	= 62,5 mm	—1,5	+ 1,5	+ 11 mm
5	+ 9,0	= 116 mm³	—2,0	+ 5,5	= 20 mm³
5	+ 1,0	= 5,2	—0,5	+ 4,0	= 0,8
15	— 4,0	μMole O_2	—3,0	+ 6,5	μMol O_2
30	— 7,0		—6,0	+ 8,0	
60					

Also sehr starke Hemmung der Katalase durch Blausäure. Nach dem Versuch wurden die Zellen in Kulturlösung übergeführt und Photosynthese und Wachstum wurden gemessen.

Aus I	Aus II	Aus III
Normale Photosynthese Normales Wachstum	Normale Photosynthese Normales Wachstum	fast keine Photosynthese Wachstum *sehr* langsam

Der Versuch zeigt, daß bei Lichtversuchen mit Blausäure die giftige Wirkung der Blausäure von dem H_2O_2 herrührt, das sich in HCN im Licht anhäuft.

Versuch vom 21. 5. 59. *Chlorella* (2täg. Süd-Kultur) suspendiert in $m/50$-KH_2PO_4, pH 4,3, Gasraum O_2 oder CO_2 *mit variierten O_2-Drucken*, in $n/100$-HCN belichtet. *Messung der H_2O_2-Bildung* nach Zentrifugieren im Überstand mit 2.7-Dihydro-naphtalin.

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III	Gefäß IV
Hauptraum:	100 mm³ *Chlorella*	→	→	→
	3 cm³ KH_2PO_4	→	→	→
Birne:	0,3 cm³ $n/10$ HCN	→	→	→
Gasraum:	20 Vol.-% CO_2-Argon	20 Vol.-% CO_2-Luft	20 Vol.-% CO_2—O_2	O_2
	H_2O_2 nach 120 Min. Belichtung			
	keines	keines	8,3 μMole	1,6 μMole

Bei diesem Versuch ist der Unterschied zwischen O_2 und CO_2—O_2 viel größer als bei dem Versuch vom 10. 7. 59. — Der Versuch zeigt, daß zur H_2O_2-Bildung in *Chlorella* ein hoher O_2-Druck notwendig ist. — Die Zellen aus den Gefäßen III und IV zeigten nach Überführung in Kulturlösung keine Photosynthese und kein Wachstum.

Versuch vom 10. 7. 59. *Chlorella* (2tägige Süd-Kultur) suspendiert in *m*/50-$MgSO_4$, Gasraum O_2 oder CO_2—O_2, in *n*/100-HCN belichtet. *Messung des O_2-Verbrauchs und der H_2O_2-Bildung.*

	Gefäß I k_{O_2} = 1,604 mm² im Gasraum keine CO_2		Gefäß II k_{O_2} = 1,665 mm² im Gasraum CO_2
Hauptraum:	100 mm³ *Chlorella* 3 cm³ *m*/50-$MgSO_4$		→ →
Birne:	0,3 cm³ *n*/10-HCN		→
Gasraum:	O_2		20 Vol.-% CO_2—O_2
	[Min.]	hell [mm]	hell [mm]
	5	— 3,5	— 3,0
	5	— 6,0	— 6,0
	5	— 5,0	— 5,5
	20	— 6,5	—10,5
	25	0	— 4,0
	60	—21,0	—29,0
	=	— 33,6 mm³ O_2	= — 48 mm³ O_2
	=	— 1,5 μMole O_2	= — 2,14 μMole O_2
	H_2O_2-Bildung	3,0 μMole	4,12 μMole
	+ H_2O_2 — O_2	— 2,0	— 1,92

Versuch vom 26. 5. 59. *Chlorella* (2tägige Südfenster-Kultur), suspendiert in *m*/50-KH_2PO_4, 0,5% $MgSO_4$ (7 H_2O), pH 4,3, Gasraum O_2 mit variierten CO_2-Gehalten, belichtet in *n*/100-Blausäure. Erheblicher Einfluß des CO_2-Gehalts auf die H_2O_2-Bildung.

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III	Gefäß IV
Hauptraum:	100 mm³ *Chlorella* in 3 cm³ *m*/50-KH_2PO_4 0,5% $MgSO_4$ (7 H_2O)	→ →	→ →	→ →
Birne:	0,3 *n*/10-HCN	→	→	→
Gasraum:	O_2	5 Vol.-% CO_2—O_2	10 Vol.-% CO_2—O_2	20 Vol.-% CO_2—O_2
H_2O_2 nach 120 Min. Belichtung	0,8 μMol	3,3 μMole	4,1 μMole	5,0 μMole

Versuch vom 9. 7. 59. *Chlorella* (2-tägige Südfenster-Kultur) suspendiert in *m*/50-KH_2PO_4, pH 4,3, in *n*/100-HCN belichtet. Gasraum 2 Vol.-% CO_2—O_2. *Ändert sich dabei der Partialdruck der Kohlensäure?* Gefäß Abb. 1 dieser Arbeit.

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
	k_{O_2} = 1,603 mm² k_{CO_2} = 1,908 mm²	k_{O_2} = 1,592 mm² k_{CO_2} = 1,897 mm²	k_{O_2} = 1,609 mm² k_{CO_2} = 1,914 mm²
Hauptraum:	100 mm³ *Chlorella* in 3 cm³ *m*/50-KH_2PO_4 pH 4,3		
Birne I:	0,3 cm³ *n*/10-HCN		
Birne II:	21 mg $K_4Fe(CN)_6$ + 3 H_2O in 0,2 cm³ H_2O	→	→

Wanne: 2,6 mg $KMnO_4$ in 0,2 cm^3 H_2O

Gasraum: 2 Vol.-% CO_2—O_2

dunkel Bei t_0 B_I in Hauptraum Bei t_0 B_{II} in Wanne		hell → Nach 60 Min. hell B_{II} in Wanne		dunkel → Nach 60 Min. dunkel B_{II} in Wanne	
[Min.]	[mm]	[Min.]	[mm]	[Min.]	[mm]
5	—194,5	5	—191,5	5	—244,5
5	— 16,0	5	— 8,5	5	— 16,5
5	— 7,0*	5	— 1,5*	5	— 6,5*
Partialdruck der CO_2	210,5 — 2 · 7 = 196,5 mm		200 — 2 · 1,5 = 197 mm		261 — 2 · 6,5 = 248 mm
			↓ $\Delta p_{CO_2} = 0$		↓ $\Delta p_{CO_2} = +41$ mm $X_{CO_2} = +41 \cdot 1{,}914$ $= +79$ mm^3 = Atmungs-CO_2

Versuch vom 8. 7. 59. *Grana* von Freilandspinat, nach Vorschrift von 1944, suspendiert in einer alkalischen Phosphatlösung unter Zusatz von wenig Bicarbonat und KCl (*m*/20-Phosphat pH 8,6, ca. $3 \cdot 10^{-3}$ *n*-$NaHCO_3$, 0,1% KCl, pH ist nach Zugabe der Grana 8,3. Ist Medium „B"). *Ändert sich der Kohlensäuregehalt in den Manometergefäßen bei Belichtung ± Chinon?* (Manometriegefäß im Text Abb. 1).

	Gefäß I $k_{CO_2} = 1{,}793$ mm^2 *ohne Chinon*	Gefäß II $k_{CO_2} = 1{,}752$ mm^2 *ohne Chinon*	Gefäß III $k_{CO_2} = 1{,}703$ mm^2 + *Chinon*	Gefäß IV $k_{CO_2} = 1{,}938$ mm^2 + *Chinon*
Hauptraum:	3 cm^3 Medium „B" + Grana (1,4 μMole Chlorophyll)	→	→	→
	—	—	0,2 mg Benzochinon	0,2 mg Benzochinon
Birne I:	0,2 cm^3 2-*n*. H_2SO_4	→	→	→
Birne II:	21 mg $K_4Fe(CN)_6$ + 3 H_2O in 0,2 cm^3 H_2O	→	→	→
Wanne:	2,6 mg $KMnO_4$ in 0,2 H_2O			
Gasraum:	Luft	→	→	→
	Bei t_0 B_I in Hauptraum	Nach 60 Min. hell B_I in Hauptraum	Bei t_0 B_I in Hauptraum	Nach 60 Min. hell B_I in Hauptraum
	+ 185 mm^3 CO_2	+ 185 mm^3 CO_2	+ 178 mm^3 CO_2	+ 182 mm^3 CO_2
	Dann B_{II} in Wanne	→	→	→
	—195 mm^3 CO_2	— 202,5 mm^3 CO_2 $\Delta_{CO_2} = +7{,}5$ mm^3 also *keine* Fixierung	— 187 mm^3 CO_2	— 192,5 mm^3 CO_2 $\Delta_{CO_2} = +5{,}5$ mm^3 also *keine* Fixierung

* O_2-Verbrauch der Atmung, die in dem Hellgefäß stark geschädigt ist.

Literatur

1 Warburg, O., Biochem. Z. 100 (1919), 230.
2 Warburg, O., Heavy Metals and Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford 1949.
3 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 509.
4 Arnon, D., Whatley, F. R., und Allen, M. B., Biochimica biophysica Acta (Amsterdam) 32 (1959), 32 und 47.
5 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 303 (1939), 40; O. Warburg, Wasserstoffübertragende Fermente, S. 44, Berlin 1948.
6 Dam, H., Advances in Enzymol. 2 (1942), 317.
7 Morton, R. A., und Mitarb., Helv. chim. Acta 41 (1958), 2343 und 2357.
8 Gloor, U., Isler, O., Morton, R. A., Rüegg, R., und Wiss, O., Helv. chim. Acta 41 (1958), 2357.
9 Martius, C., Biochem. Z. 326 (1954), 26; C. Martius und D. Nitz-Litzow, Biochem. Z. 327 (1955), 1; 329 (1957), 450.
10 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 14b (1959), 561.
11 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. Naturforschg. 6b (1951), 12; O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder und W. Buchholz, 9b (1954), 769; O. Warburg und W. Schröder, 10b (1955), 639.
12 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 66.
13 Warburg, O., und Kayser, D., Z. Naturforschg. 14b (1959), 563.
14 Warburg, O., Biochem. Z. 103 (1920), 188.
14a Warburg, O., Burk, Dean, Schocken, V., Korzenowsky, M., und Hendricks, S. B., Arch. Biochemistry 23 (1949), 330.
15 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 437.
16 Sumner, J. B., Science (New York) 100 (1944), 413.

56 Notwendigkeit der Kohlensäure für die Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen in grünen Grana*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Die O_2-Entwicklung aus grünen Grana durch Chinon oder Ferricyanid erfolgt nur bei Gegenwart von Kohlensäure, ihre Geschwindigkeit wird von dem Druck der Kohlensäure bestimmt, und zwar in dem gleichen Maß, wie die Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung bei der Photosynthese in lebenden Zellen.

Wie wir im vorigen Jahr mitgeteilt haben[1], ist für die Chinonreaktionen in grünen Grana und *Chlorella*

$$2 \text{ Chinon} + 2\ H_2O = 2 \text{ Hydrochinon} + O_2$$

Kohlensäure notwendig, die aber aus der Bilanz herausfällt, weil die reduzierte Kohlensäure durch Chinon immer wieder zu Kohlensäure zurückoxydiert wird.

Wir haben nunmehr mit Hilfe einer neuen Methode[2] den Einfluß der Kohlensäure quantitativ untersucht, und zwar nicht nur für Chinon, sondern auch für Ferricyanid [$K_3Fe(CN)_6$] als Oxydans, das hier den Vorzug hat, daß es nicht flüchtig ist. Das Ergebnis ist in den Abb. 1 und 2 wiedergegeben.

Mit der gleichen Anordnung haben wir den Einfluß der Kohlensäure auf die *Photosynthese* in lebenden Zellen untersucht, und zwar für lebende Kohlrabiblätter und für lebende *Chlorella*. Das Ergebnis dieser Versuche ist in den Abb. 1a und 2a wiedergegeben.

Vergleicht man die Kurve 1 mit 1a und die Kurve 2 mit 2a, so ergibt sich das sehr wichtige Resultat, daß man für die Photosynthese und die Ferricyanid- oder Chinonreaktionen fast die gleiche Abhängigkeit vom CO_2-Druck findet, wenn man biologisches Material gleicher Herkunft vergleicht. Es ist daraus zu schließen, daß es dieselbe dissozierende CO_2-Verbindung ist, die bei der Photosynthese und bei den Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen reagiert. Der Unterschied im Verhalten der Kohlensäure ist nur der, daß bei der Photosynthese die reduzierte Kohlensäure *nur zum Teil* zu Kohlensäure zurückoxydiert wird — so daß eine „Fixierung der CO_2" übrig bleibt — während bei den Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen die gesamte reduzierte Kohlensäure zu Kohlensäure zurückoxydiert wird — so daß die Kohlensäure aus der Bilanz verschwindet.

Wir sehen hiernach keine Möglichkeit mehr, anzunehmen, daß die Kohlensäure reduziert wird durch die Reaktion[3]

1.3-Diphosphoglycerinsäure + Dihydro-Nikotinsäureamid
= Triosephosphat + Phosphorsäure + Nikotinsäureamid.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960): 367.

Zusatz 1961. Zu der Tatsache, daß Kohlensäure für die Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen notwendig ist (Beitrag 51), ist durch diese Arbeit hinzugefügt worden, daß die Kohlensäure-Halbwertsdrucke bei Lichtsättigung die gleichen sind wie bei der Photosynthese. Dies beweist, daß es auch bei den Chinon- und Ferricyanid-Reaktionen eine Kohlensäureverbindung ist, die im Licht durch Sauerstoffentwicklung reduziert wird.

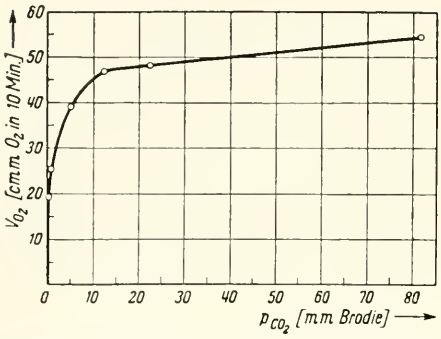


Abb. 1. Kohlrabi-Chloroplasten. p_{CO_2} = CO_2-Druck. v_{O_2} = Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung durch $K_3Fe(CN)_6$.

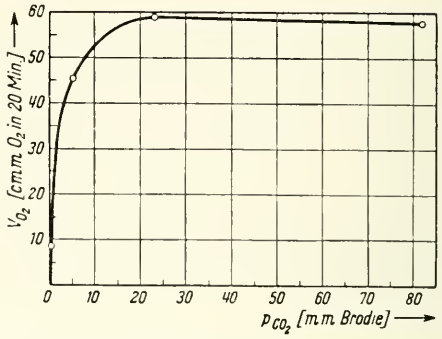


Abb. 1a. Kohlrabi-Blatt. p_{CO_2} = CO_2-Druck. v_{O_2} = Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung durch Photosynthese.

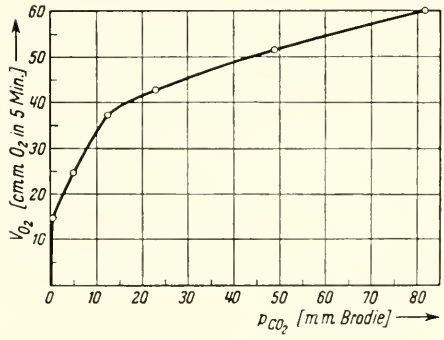


Abb. 2. Mit Chinon vergiftete *Chlorella*. p_{CO_2} = CO_2-Druck. v_{O_2} = Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung durch Chinon.

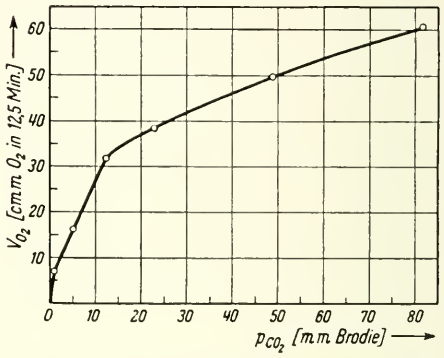


Abb. 2 a. Lebende *Chlorella*. p_{CO_2} = CO_2-Druck. v_{O_2} = Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung durch Photosynthese.

Erläuterungen

Gewinnung der Chloroplasten. Kohlrabiblätter wurden im „Starmix" zerkleinert, der Saft wurde durch kurzes Zentrifugieren von den großen Teilen befreit, durch stärkeres Zentrifugieren wurden die Chloroplasten sedimentiert. Sie wurden 3mal auf der Zentrifuge mit *m*/20-Phosphat pH 6,5 *m*/100-KCl gewaschen und schließlich mit dem gleichen Medium auf 3 cm^3 aufgefüllt. Der Chlorophyll-Gehalt in 3 cm^3 betrug etwa 4 μMole.

Zur Manometrie wurden die Anhängergefäße[2] benutzt. Es enthielt der Hauptraum 3 cm^3 Chloroplasten-Suspension, die Birne 20 μMole $K_3Fe(CN)_6$ (die 5 μMole O_2 entwickeln können), der Anhänger 3 cm^3 eines $^1/_5$ molaren Carbonatgemisches und 2 mg Cartase, der Gasraum Argon. Die Temperatur war 20^0. Eingestrahlt wurde weißes Licht der Quantenintensität 800 mm^3 Quanten pro Minute. Die Absorption war vollständig. Vor Zugabe des Ferricyanids wurde 1 Stunde belichtet, eine unerläßliche Maßnahme, um CO_2-Spuren und ihre Vorstufen zu entfernen, darunter wahrscheinlich Oxalsäure.

Das Ergebnis für CO_2-Drucke von 0,28 mm und von 82 mm ist in Abb. 3 graphisch dargestellt. Die hierbei beobachtete Anfangsgeschwindigkeit ist v_{O_2} der Kurve 1. p_{CO_2} der Kurve 1 ist aus der Tabelle der Carbonatgemische[2] entnommen.

Die Kurve 1 a für die *Kohlrabi-Blätter* wurde mit Hilfe der Carbonatgemische gewonnen. Die gesamte in das Blatt eingestrahlte Quantenintensität betrug 50 mm^3 Quanten pro Minute.

Chlorella (2tägige Südzellen, Vermehrung von 60 auf 487 mm^3) wurde 8mal mit Kulturlösung pH 4,3 gewaschen, der pro cm^3 0,05 μMol Chinon zugesetzt waren. Zweck dieser Vorbehandlung war die Entfernung von Kohlensäurequellen, vor allem der Glutaminsäure. Würde man auf diese Weise nicht vorbehandeln, so würde nachher bei Zugabe der größeren Menge Chinon eine große Menge CO_2 in den Gasraum der Manometriegefäße entwickelt.

Die vorbehandelte *Chlorella* wurde dann so konzentriert, daß 100 mm³ Zellen auf 3 cm³ Kulturlösung + 0,15 μMol Chinon kamen. Zur Manometrie wurden diese 3 cm³ in den Hauptraum von Anhängergefäßen gegeben, während die Anhänger je 3 cm³ verschiedener Carbonatgemische enthielten und 2 mg Cartase. Die Birne enthielt 20 μMole Chinon in 0,2 cm³ Wasser, der Gasraum Argon.

Zunächst wurde noch 60 Min. im Dunkeln geschüttelt; dann wurde das Chinon eingekippt und 5 Min. nach Einkippen mit der Belichtung begonnen. Die eingestrahlte Quantenintensität an weißem Licht betrug 800 mm³ Quanten pro Minute.

Das Ergebnis ist für die CO_2-Drucke 0,28 und 82 mm Brodie in Abb. 4 graphisch dargestellt. Die hierbei beobachtete Anfangsgeschwindigkeit der O_2-Entwicklung ist die Größe v_{O_2} der Kurve 2; p_{CO_2} ist der Kohlensäuredruck in mm Brodie, dessen Werte für die verschiedenen Carbonatgemische aus unserer Tabelle entnommen sind[2].

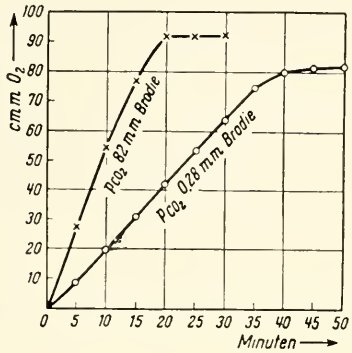


Abb. 3. O_2-Entwicklung aus belichteten Kohlrabi-Chloroplasten durch 20 μMole $K_3Fe(CN)_6$.

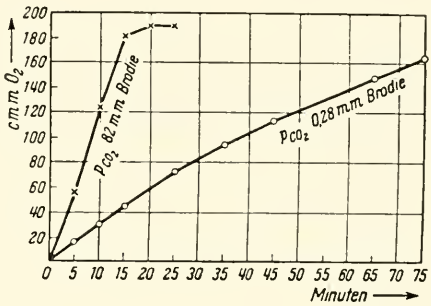


Abb. 4. O_2-Entwicklung aus belichteter *Chlorella* durch 20 μMole Chinon.

Man beachte in diesen Vorschriften die Vorbehandlung der Grana oder der *Chlorella*, ohne deren Befolgung klare Ergebnisse nicht zu erhalten sind. Jede Vorbehandlung dient dazu, Quellen der Kohlensäure zu entfernen. Grana werden im Licht, *Chlorella* wird im Dunkeln vorbehandelt. Offenbar ist die Schwierigkeit einer vollständigen Entfernung der Kohlensäure der Umstand, daß die Kohlensäure in 3 Formen an einem Kreislauf teilnimmt, als CO_2 und als oxydierte CO_2 und als reduzierte CO_2 und daß nur die CO_2 durch das Alkali im Anhänger aus dem Kreislauf herausgenommen werden kann.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 509.

2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 15b (1960), 364.

3 Diese Reaktion, die den Mittelpunkt der heutigen Photosynthese-Theorien bildet, ist zwar von uns 1939 entdeckt, aber niemals als diejenige Reaktion betrachtet worden, in der die Kohlensäure bei der Photosynthese reduziert wird [vgl. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. 303 (1939), 40, und E. Negelein und H. Brömel, Biochem. Z. 303 (1939), 132].

4 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. Naturforschg. 14b (1959), 712.

57 1-Gefäßmethode zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese* (Vergl. Beiträge Nr. 42, Nr. 53, Nr. 79 und Nr. 80.)

Von Otto Warburg, Günther Krippahl und Hans-Werner Gattung

Der Quantenbedarf der Photosynthese der *Chlorella* wird mit einer neuen manometrischen 1-Gefäßmethode bestimmt, bei der Bicarbonat-Carbonatgemische, die in den Manometriegefäßen räumlich von den Algen getrennt sind, den CO_2-Druck konstant halten. Mit dieser sehr einfachen Methode ist der Quantenbedarf der O_2-Entwicklung aus Kohlensäure etwa gleich 2,8 gefunden worden, was im Rot fast 100proz. Umwandlung der absorbierten Lichtenergie in chemische Energie bedeutet.

Die kürzlich beschriebene Kompensationsmethode[1] zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese ist inzwischen in der Richtung weiterentwickelt worden, daß die manometrische 2-Gefäßmethode durch eine 1-Gefäßmethode ersetzt werden kann. Man erhält dann zwar nur den O_2, nicht auch die CO_2, aber den O_2 auf eine sehr viel einfachere Weise, als mit der 2-Gefäßmethode.

Diese Weiterentwicklung ist dadurch möglich geworden, daß in den Manometriegefäßen Algen und Bicarbonat-Carbonatgemische räumlich voneinander getrennt wurden[2]. Die Konzentrationen der Gemische konnten daraufhin ohne die Gefahr einer Zellschädigung beliebig erhöht werden, und Kohlensäuredrucke von 0,03 bis zu 6% einer Atmosphäre konnten in den Manometriegefäßen soweit konstant gehalten werden, daß sich bei Atmung und Photosynthese praktisch nur der Druck des O_2 änderte. Die Konstanthaltung relativ großer CO_2-Drucke war notwendig, weil die Ausbeute bei der Photosynthese der *Chlorella* erheblich vom CO_2-Druck abhängt und erst bei CO_2-Drucken von einigen Prozenten einer Atmosphäre ihren Höchstwert erreicht[3].

Geht man von der 2-Gefäßmethode zur 1-Gefäßmethode über, so werden die *beiden* Kastengefäße durch *ein* Kegelgefäß mit großem Anhänger ersetzt, der in der vorhergehenden Mitteilung, Beitrag Nr. 42, abgebildet ist und zur Aufnahme des Carbonatgemisches und der Cartase dient. Die Mengen an Zellsuspensionen pro Gefäß, die bei der 2-Gefäßmethode 7 cm^3 waren, betragen jetzt aus geometrischen Gründen nur 3 cm^3, und die Zellmengen pro Gefäß betragen jetzt statt 200 mm^3 nur 50 mm^3. Alles übrige ist genau so, wie für die 2-Gefäßmethode beschrieben, vor

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960): 370.

Zusatz 1961. Wir hatten immer gehofft, daß die Kritiker der 2-Gefäß-Methode selbst eine 1-Gefäßmethode entwickeln und damit ihrerseits einen konstruktiven Beitrag zur Untersuchung der Photosynthese liefern würden. Jedenfalls ist nunmehr bewiesen, wie unberechtigt die Kritik an der 2-Gefäßmethode gewesen ist, die immer die wichtigste Methode der biologischen Manometrie bleiben wird, da sie in *einem* Versuch nicht nur den Umsatz des Sauerstoffs, sondern auch der Kohlensäure liefert. Es ist wahr, daß man die Methode mißbrauchen kann, wie es zum Beispiel von Emerson geschehen ist. Aber man kann auch 1-Gefäßmethoden mißbrauchen. Abusus non tollet usum.

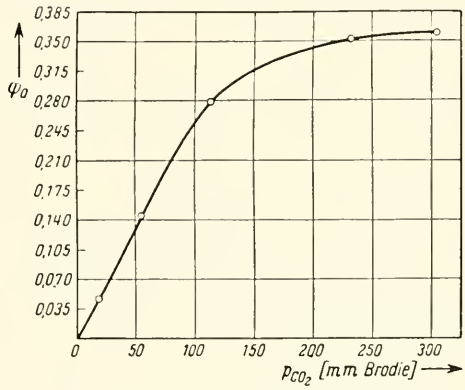
allem die Kompensation der Atmung mit blaugrünem Licht, ohne die lange Versuche unmöglich sind.

Das Ergebnis einer Versuchsreihe, bei der die CO_2-Drucke von 8 mm bis 202 mm Brodie, also von 0,2% bis 3% einer Atmosphäre variiert wurden, ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die auf der Abszissenaxe abgetragenen CO_2-Drucke wurden mit 2- und 3-*m*. Carbonatgemischen durch Variation von Bicarbonat und Carbonat hergestellt; die auf der Ordinatenaxe abgetragenen Werte von φ_0 wurden durch geringfügige Interpolation aus 2 Messungen bei höheren Intensitäten gewonnen, wie in dem Versuchsbeispiel erläutert.

Die Kurve der Abb. 1 zeigt, wie die Ausbeute φ_0 mit wachsendem CO_2-Druck steigt und bei einem CO_2-Druck von etwa 3% einer Atmosphäre einen Grenzwert erreicht, der nicht überschritten werden kann. Dieser Grenzwert beträgt

$$\varphi_0 = 0{,}364 \qquad 1/\varphi_0 = 2{,}75$$

und ist gerade derjenige Wert, der im Rot der energetisch mögliche Grenzwert ist, wenn die molare Spaltungsenergie der Kohlensäure 112000 cal. beträgt. Es mag



Legende zu Abb. 1
Ausbeute φ_0 von *Chlorella* als Funktion des CO_2-Drucks P_{CO_2}.*

Molarität [Mole/l]	Gemisch $\left[\frac{cm^3\ KHCO_3}{cm^3\ K_2CO_3}\right]$	P_{CO_2} [mm Brodie]	$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{cmm Quant.}}{\text{cmm } O_2}$	$\varphi = \frac{\text{cmm } O_2}{\text{cmm Quant.}}$
2	30/70	8,0	21	0,0477
2	50/50	31,0	6,88	0,145
2	65/35	75,5	3,6	0,278
2	75/25	140	2,83	0,354
3	75/25	202	2,75	0,364

selbstverständlich erscheinen, daß dies derselbe Grenzwert ist, den wir mit der 2-Gefäßmethode gefunden haben[1], da sich die Algen bei beiden Methoden in dem gleichen Medium — ihrem Kulturmedium — und auch sonst unter gleichen

* *Zusatz 1961.* Korrigierte Kurve findet man in Beitrag Nr. 80 dieses Buches.

äußeren Bedingungen befanden. Trotzdem wird man die Übereinstimmung der Ergebnisse als eine Kontrolle der beiden manometrischen Methoden betrachten dürfen.

Die Ausbeute bei dem CO_2-Druck von 20 mm Brodie (= 0,2 % einer Atmosphäre) ist aus historischen Gründen von Interesse, da 20 mm Brodie der CO_2-Druck des Carbonatgemischs gewesen ist, in dem vor 20 Jahren EMERSON die maximale Ausbeute der Photosynthese zu bestimmen versuchte[4]. Abb. 1 zeigt, daß man bei diesem CO_2-Druck nur einen kleinen Bruchteil der maximalen Ausbeute der *Chlorella* erhält. Manometrisch wirkt sich dies so aus (Abb. 3 und 4), daß man unter sonst völlig gleichen Bedingungen bei EMERSONS CO_2-Druck in 60 Minuten und $\mathcal{J}_0$ = 5 cmm Quanten pro Minute 9,4 mm³ O_2-Druck erhält, während man beim optimalen CO_2-Druck 45 mm³ O_2-Druck erhält. JAMES FRANCK, EUGÈNE RABINOWITSCH und HANS GAFFRON[5] haben ihre Thermodynamik der Photosynthese im wesentlichen auf diese Experimente EMERSONS aufgebaut.*

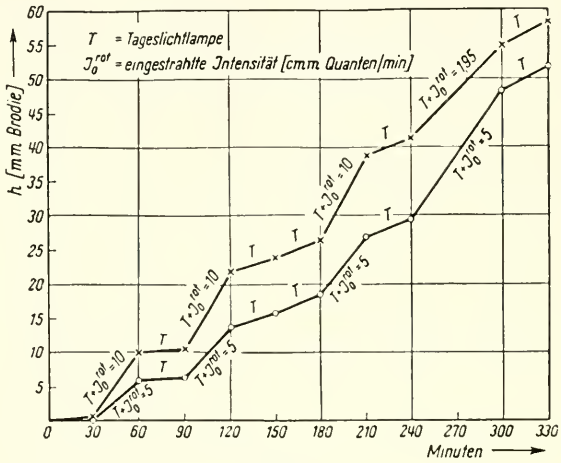


Abb. 2.

Gefäß obere Kurve:
v = 39,95 cm³
$k_{O_2}^{20°}$ = 3,29 (korr.)

Gefäß untere Kurve:
v = 41,65
$k_{O_2}^{20°}$ = 3,46 (korr.)

Hauptraum:
50 mm³ Zellen in 3 cm³ Kulturlösung Absorption für das rote Licht 63 % →

Anhänger:
3 cm³ 3-*m*. Gemisch 75 Bic. 25 Carb. + 2 mg Cartase →

Gasraum:
Luft + 306 mm Brodie CO_2-Druck →

Mit Tageslichtlampe kontinuierlich diffus belichtet. Roter Strahl aus 500-Watt-Metallfadenlampe. Filter 5 cm fließendes Wasser, 2 cm 2 proz. $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$, 2 mm RG 1 Schott.

---

* Der Experimentator dieses Kreises ist seit einigen Jahren ALAN BROWN, der mit Massenspektrograph und Isotopen erfolglos versucht, die Tatsachen, die mit den Methoden der Strahlungsphysik, der Chemie und der Manometrie gefunden worden sind, zu widerlegen. Mit Massenspektograph und Isotopen hat BROWN bewiesen, daß die Schlüsselreaktion der Photosynthese, die lichtinduzierte Atmung, nicht existiert.

Aus den Daten der Kurve und Legende folgt:

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{J_0 \cdot \text{Zeit} \cdot 0{,}63}{h \cdot k_{O_2}} \quad \text{für} \quad \begin{array}{l} J_0 = 10 \quad : 1/\varphi = 6{,}4;\ 5{,}61;\ 5{,}75. \\ J_0 = 5 \quad : 1/\varphi = 4{,}75;\ 4{,}37;\ 4{,}55;\ 4{,}20. \\ J_0 = 1{,}95 : 1/\varphi = 3{,}0. \end{array}$$

Abb. 3 zeigt, in welcher Weise φ aus den Daten der Abb. 2 berechnet wurde.

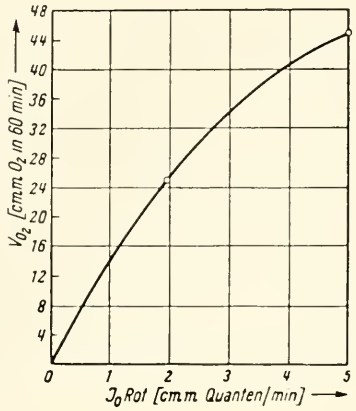


Abb. 3.
Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung v_{O_2} als Funktion der eingestrahlten Quantenintensität J_0. CO_2-Druck 306 mm Brodie. Lichtabsorption 63%.

$1/\varphi$ für $J_0 = 5$ gemessen $\quad \dfrac{5 \cdot 60 \cdot 0{,}63}{45} = 4{,}2$

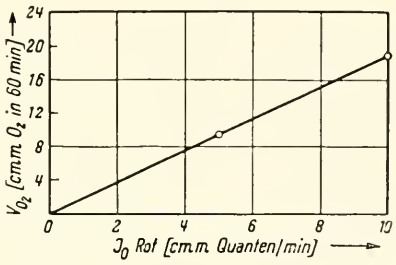
$1/\varphi$ für $J_0 = 1{,}95$ gemessen $\quad \dfrac{1{,}95 \cdot 60 \cdot 0{,}63}{24{,}7} = 2{,}98$

$1/\varphi$ für $J_0 = 1$ interpoliert $\quad \dfrac{1 \cdot 60 \cdot 0{,}63}{13{,}7} = 2{,}76$

Abb. 4 zeigt, wie gering die Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung ist, wenn der CO_2-Druck $p_{CO_2} = 19{,}5$ mm Brodie beträgt.

Abb. 4.
Geschwindigkeit der O_2-Entwicklung v_{O_2} als Funktion der eingestrahlten Quantenintensität J_0 bei dem CO_2-Druck $p_{CO_2} = 19{,}5$ mm Brodie. $1/\varphi$ für $J_0 = 5$: Lichtabsorption 63%.

$$\frac{60 \cdot 5 \cdot 0{,}63}{9{,}4} = 20{,}1\ .\ \varphi = 0{,}05\ .$$



Ein Versuchsbeispiel ist in Abb. 2 (vorige Seite) graphisch dargestellt. Mit Hilfe der Daten in der Legende können die Ausbeuten daraus berechnet werden.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 15b (1960), 190.
2 Warburg, O. und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 15b (1960), 364.
3 Warburg, O., Geleick, H., und Briese, K., Z. Naturforschg. 6b (1951), 285.
4 Emerson, R., und Lewis, C. M., Amer. Botany 26 (1939), 808; 28 (1941), 789.
5 Franck, J., und Gaffron, H., Advances in Enzymol. 1 (1941), 200.

58 Stoffwechsel von embryonalen Zellen und von Krebszellen*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und
August-Wilhelm Geissler

Vergleich von embryonalen Mäusezellen mit Mäuse-Asciteskrebszellen und Diskussion der in diesen Zusammenhang gehörenden Versuche von *Wilton Earle* und *Dean Burk*.

Seit die unzureichende Atmung und die zu große Gärung der Krebszellen entdeckt wurden, sind als neues Versuchsmaterial für manometrische Stoffwechselmessungen die Mäuse-Asciteskrebszellen eingeführt worden. Anders als die soliden Tumoren, die alle histologisch unreine Mischgewebe sind, besteht der Mäuse-Asciteskrebs[1] fast ausschließlich aus Krebszellen. Der Stoffwechsel dieser Zellen ist 1950 in Dahlem gemessen worden[2]. Es hat sich bei dieser ersten Messung des Stoffwechsels reiner Krebszellen gezeigt, daß die wahre Gärung der Krebszellen viel größer ist, als man früher auf Grund der Versuche mit den histologisch unreinen Tumoren geglaubt hatte. Deshalb ist der Übergang von den soliden Tumoren zu dem Asciteskrebs, von den Mischgeweben zu den reinen Krebszellen, ein sehr großer Fortschritt gewesen.

In der letzten Zeit haben wir uns bemüht, zu Vergleichszwecken normale Mäusezellen zu finden, die ein gleich günstiges Objekt für Stoffwechselmessungen sind wie die Asciteskrebszellen; die ebenso schnell wachsen; die histologisch ebenso rein sind; und die gegen das Schütteln in den Manometriegefäßen ebenso resistent sind. Allen diesen Bedingungen genügen die Häute der Fruchtblase, Amnion und Chorion[3] junger Mäuse-Embryonen. Es ist ein Material, das man sich leicht in genügenden Mengen verschaffen kann und das so dünn ist, daß man es für manometrische Stoffwechselmessungen nicht zu schneiden braucht. Embryonen dagegen sind für derartige Versuche ungeeignet, weil sie wegen ihrer weichen Konsistenz bei der Bewegung in den Manometriegefäßen zerschüttelt werden, und außerdem, weil ihre Schichtdicke für manometrische Messungen zu groß ist.

Da man heute weiß, daß Ringerlösung und die als Ersatz dafür vorgeschlagenen Salzlösungen tierische Zellen schädigen und ihren Stoffwechsel verändern, dürfen Salzlösungen nicht mehr als Medien für Stoffwechselmessungen benutzt werden. Tatsächlich kommt heute als Medium nur noch Serum in Betracht, und zwar arteigenes Serum. Allerdings sind für einen vollständigen Stoffwechselversuch, zu dem die Retentionsbestimmungen gehören, 35 cm^3 Serum notwendig. Aber es ist leicht, derartig große Mengen Serum von Asciteskrebs-Mäusen zu gewinnen, und so macht es heute keine Schwierigkeiten mehr, den Stoffwechsel von Mäusezellen in Mäuseserum zu messen.

Wir fanden in Mäuse-Ascitesserum im Mittel die folgenden Stoffwechselquotienten für embryonale Zellen und Asciteskrebszellen der Maus, bei 38^0, für die 1. Stunde, in 5 Vol.-Proz. CO_2 in Sauerstoff oder in Argon. Q bedeutet mm^3 pro mg Trockengewicht und Stunde:

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 11b (1956): 657.

	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	Q Meyerhof
(Embryonale Zellen Chorion — Amnion)	—16	0	+36	2,3
Krebszellen (Ascites)	— 8	+25	+75	6,3

Hiernach ist der anaerobe Gärungswert der Asciteskrebszellen etwa doppelt so hoch wie der früher für Tumorschnitte erhaltene Höchstwert. $Q = +75$ bedeutet, daß die Krebszellen pro Stunde 30 % ihres Trockengewichts an Milchsäure produzieren.

Neu gegenüber den früheren Versuchen mit soliden Tumoren ist ferner der hohe Meyerhof-Quotient der Asciteskrebszellen, der im Mittel 6 beträgt. Wenn früher für Krebszellen Meyerhof-Quotienten von 1 und 2 gefunden worden sind, so war daran das unphysiologische Medium schuld, das meistens Ringerlösung war. Wenn nun trotz des hohen Meyerhof-Quotienten in den Asciteskrebszellen bei Sättigung mit Sauerstoff eine erhebliche aerobe Gärung übrigbleibt, so ist für die Asciteskrebszellen a fortiori der Satz[4] richtig, daß „die Atmung der Krebszellen zu klein ist im Vergleich zu ihrer Gärung".

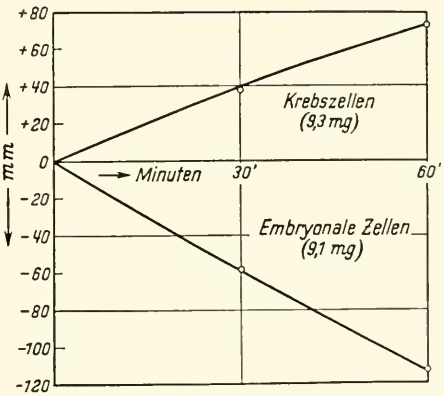


Abb. 1. Unter sonst gleichen Bedingungen erzeugen embryonale Zellen in Serum negative Drucke, Krebszellen positive Drucke (Protokolle 1 und 2).

Die Tabelle zeigt ferner, daß die embryonalen Zellen der Häute den Meyerhof-Quotienten 2 haben und daß die Atmung trotz dieses niedrigeren Meyerhof-Quotienten die Gärung auf Null bringt. — Daß die embryonalen Zellen im Leben aerob keine Milchsäure produzieren, war bereits von WIND und v. OETTINGEN[5] in Dahlem durch Versuche im Leben mit graviden Tieren gezeigt worden. Doch ist es nunmehr möglich, mit dem normalen embryonalen Stoffwechsel auch in vitro zu experimentieren.

Der große Unterschied im aeroben Stoffwechsel der embryonalen Zellen und der Krebszellen ist bei der manometrischen Versuchsanordnung bereits ohne Rechnung zu sehen. Bringt man in zwei gleiche Manometriegefäße gleich viel Serum und gleich viel Krebszellen oder embryonale Zellen, sättigt mit 5 Vol.-Proz. CO_2-O_2 und schüttelt bei 38°, so erzeugen, bei den üblichen Verhältnissen $\frac{v_F}{v_G}$, die embryonalen Zellen negative Drucke, die Krebszellen aber positive Drucke, weil die embryonalen Zellen nur atmen, die Krebszellen aber außerdem so stark gären, daß ihre Atmung durch die Gärung manometrisch überkompensiert wird (Abb. 1).

Unsere Ergebnisse stehen nur scheinbar in Widerspruch zu einer Arbeit von O'Connor[6]. O'Connor wiederholte 1950 unsere Versuche von 1925 mit Embryonen in Ringerlösung und bestätigte, daß dabei die Atmung so erheblich geschädigt wird, daß sie nicht mehr auf die Gärung wirkt und daß infolgedessen eine aerobe Gärung erscheint. Er zählte dabei die Mitosen und fand Proportionalität zur aeroben Gärung. Aber die Mitosen, die O'Connor gezählt hat, sind nicht in der Ringerlösung entstanden, sondern im Leben, *vor* dem Einbringen der Embryonen in die Ringerlösung, und haben deshalb durchaus nichts mit der aeroben Gärung in der Ringerlösung zu tun. Es ist eine Mißdeutung altbekannter Tatsachen, wenn O'Connor aus seinen Versuchen den Schluß zieht, daß die embryonale Entwicklung tierischer Zellen ein anaerober Vorgang sei.

Ebenso unrichtig ist die Behauptung, daß die Furchung der Froscheier in den ersten Stadien ein anaerober Vorgang sei, denn die zugrunde liegenden Versuche — Furchung nach Austreibung des Sauerstoffs aus den Eiern — bedeuten lediglich, daß es schwer ist, diejenigen Spuren von Sauerstoff aus Froscheiern auszutreiben, die von der Furchung benötigt werden. Wer jemals gesehen hat, wie Blausäure die Furchung von Seeigeleiern hemmt, und zwar in dem Maße hemmt[7], als Blausäure die Atmung hemmt, kann die Anaerobiose der Amphibieneier nicht ernst nehmen. Statt vergeblich zu versuchen, Sauerstoffspuren zu entfernen, muß man derartige Probleme mit Hilfe von Blausäure untersuchen. Derartige Versuche mit Molcheiern, die in der letzten Zeit von Tiedemann[8] mitgeteilt wurden, zeigen, daß auch die Amphibieneier gegen die Hemmung ihrer Atmung sehr empfindlich sind.

Schließlich sei hier noch, wenn auch nicht direkt in den Zusammenhang dieser Arbeit gehörend, die Angabe von Dickens und Weil-Malherbe[9] erwähnt, daß das abgetrennte Mark der Niere, das sind im wesentlichen die Harnkanälchen, in den Manometriegefäßen aerob gärt. Dies widersprach unsern früheren Ergebnissen[10], daß die lebende Niere an den Blutstrom keine Milchsäure abgibt, sondern umgekehrt Milchsäure aus dem Blutstrom herausnimmt. Wir prüften deshalb die Versuche von Dickens nach und fanden für Mark von Rattennieren in Rattenserum bei 38° in den Manometriegefäßen die folgenden Stoffwechselquotienten: (Protokoll III).

Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}
— 6	0	+15

also in Übereinstimmung mit unsern in-vivo-Versuchen keine aerobe Gärung.*

Merkwürdigerweise wird oft manometrischen Versuchen mit zerstückelten Geweben, z. B. den Versuchen von Dickens und O'Connor, größere Bedeutung bei-

* *Zusatz 1961.* Wir haben uns inzwischen weiter bemüht, die Angaben von Dickens zu bestätigen, zumal er seine biologische Manometrie hier in Dahlem gelernt hat. Dabei fanden wir, daß wenn man die *Spitzen* der Pyramiden schneidet, man in der Regel kleine aerobe Gärungen findet. Niemand wird daraufhin annehmen, daß *das Wachstum* der Niere ein partiell anaerober Vorgang ist, worauf es alleine beim Vergleich mit Krebszellen ankommt.

gemessen als unseren Versuchen mit lebenden Geweben im lebenden Tier. Und doch ist keine Diskussion darüber möglich, daß die Versuche in vivo den Vorrang haben. Stimmen die manometrischen Versuche dazu, so hat man die Möglichkeit, unter einfacheren Bedingungen zu experimentieren. Stimmen sie nicht dazu, so sind die manometrischen Versuche biologisch wertlos. Erkennt man dieses Prinzip an, so wird man sagen müssen, daß aerob gärende Zellen, die *wachsen*, bisher unter den normalen Körperzellen nicht gefunden worden sind.

Wenn nun aus alledem der Schluß gezogen werden mußte, daß normale Körperzellen unter ihren normalen Lebensbedingungen, d. h. unter aeroben Bedingungen, nicht gären, während es Krebszellen ohne aerobe Gärung nicht gibt, so ist doch erst in diesem Jahr durch eine Arbeit aus dem Laboratorium von DEAN BURK[11] der Zusammenhang zwischen Malignität und Gärung endgültig bewiesen worden. Hier wurde der Stoffwechsel von Krebszellen gemessen, die von EARLE[12] bei der Gewebekultur aus normalen Gewebezellen erhalten worden waren. EARLE war dabei von einzelnen normalen Mäusezellen ausgegangen, bei deren Weiterzüchtung im Lauf von Jahren Krebszellen entstanden, die wiederum von einzelnen Zellen aus in vitro weitergezüchtet wurden. So erhielt EARLE zwei reine Linien von Krebszellen, von denen sich jede mit konstanten Eigenschaften — Wachstumsgeschwindigkeit und Virulenz — weiterzüchten ließ. Die niedrigvirulente Linie erzeugte bei der Verimpfung auf Mäuse in 1% der Impfungen Tumoren, die hochvirulente Linie erzeugte in 100% der Impfungen Tumoren.

Für Stoffwechselversuche waren diese Kulturen besonders geeignet, weil es flüssige Massenkulturen freilebender Krebszellen waren, die sich unter Bewegung auf der Schüttelmaschine histologisch und physiologisch einheitlich wie Hefezellen vermehrten. Einen Unterschied zwischen in vivo und in vitro gab es für diese Zellen nicht mehr.

Diese wachsenden Flüssigkeitskulturen wurden direkt in die Manometriegefäße übertragen, und hier wurden für die wachsenden Krebszellen die folgenden Stoffwechselquotienten gefunden:

	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	Q_{Meyerhof}
Niedrigvirulente Krebszellen	— 12,5	+ 10	+ 25	1,2
Hochvirulente Krebszellen	— 7,5	+ 30	+ 70	5,3

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die hochvirulenten Krebszellen aerob wie anaerob etwa 3mal so stark gären wie die niedrigvirulenten Krebszellen; daß aber umgekehrt die niedrigvirulenten Krebszellen *stärker atmen* als die hochvirulenten. Berechnet man aus der Summe von Atmung + aerober Gärung die aerobe Gesamtproduktion an Kalorien, so findet man etwa den gleichen Wert für die hochvirulenten und die niedrigvirulenten Zellen; aber der Anteil der Gärung an der Gesamt-Energieproduktion ist verschieden. Je größer der Anteil der Gärung an der Energieproduktion, um so virulenter sind die Krebszellen. In den hochvirulenten

Krebszellen beträgt der Anteil der Gärung an der Energieproduktion 30 %, in den niedrigvirulenten Krebszellen beträgt er nur 11 Prozent.

Hiermit ist der Zusammenhang zwischen Malignität und Gärung unwiderleglich bewiesen; und weiterhin und ebenso wichtig, hiermit ist der Zusammenhang zwischen der Malignität und der zu kleinen Atmung unwiderleglich bewiesen. Es sind ferner nunmehr alle wesentlichen Einwände auf diesem Gebiet widerlegt. Man kann nicht mehr sagen, daß der besondere Stoffwechsel der Krebszellen von ihren Ursprungszellen herrühre, da beide Linien, die niedrig- und die hochvirulente Linie, von derselben normalen Zelle abstammen. Man kann nicht mehr sagen, daß die niedrige Atmung der Krebszellen eine Absterbe-Erscheinung sei, da die Virulenz *steigt*, wenn die Atmung *sinkt*. Übriggeblieben von allen Disputen ist nur noch der Streit, ob man sagen darf, daß die Atmung der Krebszellen geschädigt sei, während in Wirklichkeit die Atmung der normalen Zellen geschädigt ist, aus denen die Krebszellen entstanden sind.

Schließlich sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die Q-Werte der hochvirulenten Krebszellen von Earle und der Mäuse-Asciteskrebszellen — die man zu den hochvirulenten Krebszellen rechnen muß — numerisch fast genau gleich sind. Dies ist durchaus nicht selbstverständlich, wenn man bedenkt, wie verschieden die beiden Arten von Krebszellen seit Jahren gelebt haben: die einen in den Earleschen Kulturflaschen, die anderen in lebenden Mäusen; und daß fast sicher ist, daß die beiden Zellarten von verschiedenen normalen Zellen abstammen.

Versuche

Je 0,3 cm^3 der unverdünnten Ascitesflüssigkeit wurde pro Maus überimpft. 6 Tage nach Impfung wurde der Ascites für die Versuche verwendet. Er wurde, ehe er geronnen war, klar zentrifugiert, dann 10 Min. auf 57^0 erhitzt und wieder klar zentrifugiert. Es trat dann später keine Gerinnung ein, so daß Zusatz gerinnungs-hemmender Mittel überflüssig war.

Das so gewonnene Ascites-Serum enthielt pro cm^3 1 bis 2 mg Milchsäure. Es enthielt sehr wenig Zucker, von dem immer 2 mg pro cm^3 als Glucose zugesetzt wurde. Bicarbonat wurde immer gemessen, und wenn der Gehalt zu klein war, wurde bis 350 mm^3 $NaHCO_3$ pro cm^3 zugesetzt.

Von einer Ascites-Maus gewannen wir etwa 5 cm^3 Serum. Etwa 35 cm^3 Serum waren für jeden vollständigen Stoffwechselversuch, einschließlich der Retentionsbestimmungen, notwendig. — Ascites-Serum enthält weniger Protein als Normalserum und hat deshalb eine niedrigere CO_2-Retention.

Retention der Kohlensäure. Über Retentionsbestimmungen ohne umständliche Rechnungen ist in einer früheren Arbeit ausführlich berichtet[13]. Bei der Bestimmung der CO_2-Retention erzeugen wir den gewünschten CO_2-Druck durch Einkippen von überschüssiger Schwefelsäure in eine gemessene Bicarbonatlösung, in „siamesischen" Birnen. Die Milchsäure-Retention bestimmen wir in Gefäßen, die etwa so groß sind wie die Versuchsgefäße, durch Einkippen einer gemessenen Menge Schwefelsäure in die gleiche Serummenge, die zum Versuch verwendet wird.

Wenn Zellen, wie die embryonalen Zellen, nur atmen und nicht gären, braucht man zur Berechnung des Stoffwechsels nur die CO_2-Retention. Wenn Zellen, wie die Krebszellen, wesentlich mehr gären als atmen, braucht man zur Berechnung des Stoffwechsels nur die Milchsäure-Retention.

Ascites-Krebszellen. Frisch entnommener 6-tägiger Mäuse-Ascites wird mit dem oben beschriebenen Ascitesserum auf die gewünschte Zellkonzentration ,im allgemeinen auf das 50fache, verdünnt.

Chorion + Amnion. Gravide Mäuse werden getötet, wenn die ersten Anzeichen der Gravidität erkennbar sind. Das Trockengewicht einer Fruchtblase (Chorion + Amnion) beträgt dann 2 bis 3 mg. 2 bis 3 Häute wurden zur Stoffwechselmessung in jedes Manometriegefäß gegeben, nach dem Versuch wurden die Trockengewichte bestimmt.

Qualitativer Test auf aerobe Gärung. Wenn man qualitativ prüfen will, ob ein Gewebe, z. B. Chorion und Amnion, aerob gärt, genügt es, die Gewebe in Ascites-Serum zu bringen, mit 5 Vol.-Proz.

CO_2-O_2 zu sättigen, bei 38° zu schütteln und zu Beginn und am Ende des Versuchs einen kleinen aliquoten Teil des Serums herauszunehmen und nach Sättigung mit 5 Vol.-Proz. CO_2-O_2 durch Einkippen von überschüssiger Säure das Bicarbonat zu bestimmen. Findet man, daß das Bicarbonat konstant geblieben ist, so ist die aerobe Gärung Null. Denn dann ist entweder keine Milchsäure aus den Zellen abgegeben worden, oder es ist ebensoviel Milchsäure von den Zellen abgegeben worden, als Milchsäure von den Zellen aus irgendeinem Grunde aufgenommen worden ist, so daß also die Bilanz Null ist.

Wir fanden, daß der Bicarbonatgehalt konstant blieb, wenn wir Fruchthüllen von 9 mg Trockengewicht in 7 cm³ Serum suspendierten und anfangs und nach 140 Min. das Bicarbonat bestimmten. Wir benutzten dabei dieselbe Pipette zur Entnahme des Serums am Anfang und am Ende.

Protokoll I

Aerober Stoffwechsel von Mäuse-Chorion + Amnion. In Mäuse-Ascitesserum, bei 38°, in 5 Vol.-Proz. CO_2-O_2. Zelltrockengewicht pro Gefäß 9,06 mg. CO_2-Retention in 7 cm³ Serum 0,50 mm³ CO_2/mm Brodie.

Kleines Gefäß: $v = 16{,}10$; $v_F = 7{,}15$ cm³; $k_{O_2} = 0{,}804$; $k_{CO_2} = 1{,}191$; $k_{CO_2}^{Serum} = 1{,}691$.

Großes Gefäß: $v = 23{,}34$; $v_F = 7{,}15$ cm³; $k_{O_2} = 1{,}437$; $k_{CO_2} = 1{,}825$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}325$.

Berechnung: $x_{O_2} = H' \cdot 3{,}46 - H \cdot 4{,}75$, $x_{CO_2} = -H' \cdot 5{,}63 + H \cdot 10{,}1$

Die beobachteten Druckänderungen waren:

	Kleines Gefäß (H') [mm]	Großes Gefäß (H) [mm]	x_{O_2} [mm³]	x_{CO_2} [mm³]	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$Q_M^{O_2}$
30′	— 58,5	— 26	— 79	+ 66	— 17,4	+ 14,6	0
30′	— 54,5	— 26	— 65	+ 42	— 14,3	+ 9,3	0
30′	— 48,5	— 21	— 68	+ 57	— 14,6	— 12,6	0
30′	— 44,0	— 19	— 69	+ 65	— 15,2	— 14,3	0
Mittel					— 15,4	+ 12,7	

Anaerober Stoffwechsel von Mäuse-Chorion + Amnion. In Mäuse-Ascitesserum, bei 38°, in 5 Vol.-Proz. CO_2-Argon. Zelltrockengewicht 4,05 mg von derselben Maus wie beim aeroben Versuch. Milchsäure-Retention in 7 cm³ Serum 1,00 mm³ CO_2/mm Brodie.

Gefäß: $v = 16{,}5$; $v_F = 7{,}15$ cm³; $k_{CO_2} = 1{,}226$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}226$.

Berechnung: $x_{CO_2} = x_M = H \cdot 2{,}226$ mm²

Beobachtete Druckänderungen:

	(H) [mm]	x_{CO_2}	Q_M^{Argon}
15′	+ 18,5	+ 41,2	+ 40,7
15′	+ 16,5	+ 36,8	+ 36,4
15′	+ 14,5	+ 32,3	+ 32
15′	+ 16,0	+ 35,7	+ 35,2
Mittel			+ 36

Der Meyerhof-Quotient war also: $\frac{36-0}{15{,}4} = 2{,}34$.

Protokoll II

Aerober Stoffwechsel von Mäuse-Asciteskrebszellen. In Mäuse-Ascitesserum, bei 38°, bei Sättigung mit 5 Vol.-Proz. CO_2 in O_2. Zelltrockengewicht pro Gefäß 9,3 mg. Milchsäure-Retention in 7 cm³ Serum 0,93 mm³ CO_2/mm Brodie.

Kleines Gefäß: $v = 16{,}10$; $v_F = 6{,}65$ cm³; $k_{O_2} = 0{,}846$; $k_{CO_2} = 1{,}207$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}137$ mm².

Großes Gefäß: $v = 23{,}34$; $v_F = 6{,}65$ cm³; $k_{O_2} = 1{,}479$; $k_{CO_2} = 1{,}840$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}770$ mm².

Berechnung: $x_{O_2} = H' \cdot 3{,}318 - H \cdot 4{,}29$, $x_{CO_2} = -H' \cdot 6{,}29 + H \cdot 11$.

Die beobachteten Druckänderungen waren:

	Kleines Gefäß (H') [mm]	Großes Gefäß (H) [mm]	x_{O_2} [mm³]	x_{CO_2} [mm³]	Q_{O_2} [mm³]	$Q_M^{O_2}$
15′	+ 18,5	+ 16	— 6,9	+ 59,7	— 3	+ 22
15′	+ 19,5	+ 17	— 8,3	+ 64	— 3,6	+ 24
15′	+ 18,5	+ 16,5	— 9,2	+ 64,9	— 3,0	+ 24
15′	+ 15,5	+ 14,5	— 10,5	+ 62,5	— 4,5	+ 22
Mittel					— 3,5	+ 23

Anaerober Stoffwechsel derselben Mäuse-Asciteskrebszellen. In Mäuse-Ascitesserum, bei 38°, in 5 Vol.-Proz. CO_2 in Argon. Zelltrockengewicht 5 mg. Milchsäure-Retention in 7 cm³ Serum 1,00 mm³ CO_2/mm Brodie.

Gefäß: $v = 16{,}5$; $v_F = 7{,}15$ cm³; $k_{CO_2} = 1{,}226$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}226$.

Berechnung: $x_{CO_2} = x_M = H \cdot 2{,}226$ mm².

Beobachtete Druckänderungen H (mm):

	H	x_{CO_2} [mm³]	Q_M^{Argon}
15′	+ 38	+ 86	69
15′	+ 40	+ 90,5	73
15′	+ 40	+ 90,5	73
15′	+ 40	+ 90,5	73
Mittel			72

Der Meyerhof-Quotient war also: $\frac{72-23}{3{,}5} = \frac{49}{3{,}5} = 14$.

Protokoll III

Aerober Stoffwechsel von Ratten-Nierenmark (Pyramiden). In normalem Rattenserum, dem 1 mg natürliches Na-lactat pro cm³ zugesetzt war. Trockengewicht der Schnitte pro Gefäß 9,75 mg. 38°. In 5 Vol.-Proz. CO_2-O_2. CO_2-Retention in 7 cm³ Serum 0,84 mm³ CO_2/mm Brodie.

Kleines Gefäß: $v = 16{,}10$; $v_F = 7{,}5$; $k_{O_2} = 0{,}773$; $k_{CO_2} = 1{,}18$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}02$.

Großes Gefäß: $v = 23{,}34$; $v_F = 7{,}5$; $k_{O_2} = 1{,}40$; $k_{CO_2} = 1{,}807$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}647$.

Berechnung: $x_{O_2} = H' \cdot 2{,}81 - H \cdot 3{,}68$, $x_{CO_2} = -H' \cdot 5{,}30 + H \cdot 9{,}59$.

Die beobachteten Druckänderungen waren:

	Kleines Gefäß (H') [mm]	Großes Gefäß (H) [mm]	x_{O_2} [mm³]	x_{CO_2} [mm³]	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$Q_M^{O_2}$
30′	— 27,5	— 12,5	— 31	+ 25,6	— 6,4	+ 5,3	0
30′	— 25,5	— 12,5	— 25,5	+ 15,0	— 5,2	+ 3,1	0
Mittel					— 5,9	+ 4,2	

Anaerober Stoffwechsel von Ratten-Nierenmark in normalem Rattenserum, dem 1 mg natürliches Na-lactat pro cm³ zugesetzt war. Trockengewicht der Schnitte 6,78 mg. Milchsäure-Retention in 7 cm³ Serum 1,71 mm³ CO_2/mm Brodie.

Gefäß: $v = 16{,}5$; $v_F = 7{,}5$ cm³; $k_{CO_2} = 1{,}231$; $k_{CO_2}^{Serum} = 2{,}941$.

Berechnung: $x_{CO_2} = x_M = H \cdot 2{,}941$ mm².

Die abgelesenen Drucke waren:

	(H) [mm]	x_{CO_2} [mm³]	Q_M^{Argon}
30′	+ 17,5	+ 51,4	15,2
30′	+ 17,0	+ 50	14,8

Der Meyerhof-Quotient war also: $\frac{15}{5{,}9} = 2{,}54$.

Literatur

1 Der Ascites-Krebs ist zuerst von F. Hesse im Institut Robert Koch in Berlin experimentell erzeugt worden [Zbl. Bacteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg., I. Abt., Orig. 102 (1927), 367]. Löwenthal und Jahn setzten die Versuche von Hesse im gleichen Institut fort und gingen dabei von Ratten zu Mäusen über [Z. Krebsforsch. 37 (1932), 439]. G. Klein, Stockholm, erweiterte unsere Kenntnisse über den Ascites-Krebs und empfahl ihn für zellphysiologische Arbeiten [Exp. Cell Res. 2 (1951), 518]. Ihm verdanken wir den Stamm unseres Mäuse-Asciteskrebses.

2 Warburg, O., und Hiepler, E., Z. Naturforschg. 7b (1952), 193; Schade, A. L., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 12 (1953), 163; Woods, M., Hunter, J., und Burk, Dean, J. nat. Cancer Inst. 16 (1955), 351.

3 Der Stoffwechsel von Amnion und Chorion der Ratte ist auf Vorschlag und unter Leitung von O. Warburg bereits 1925 von E. Negelein in diesem Institut gemessen worden [Biochem. Z. 165 (1925), 122].

4 Warburg, O., Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926, S. 190; Warburg, O., Katalytische Wirkungen, Berlin 1927, S. 508.

5 Wind, F., und Oettingen, K. v., Biochem. Z. 197 (1928), 170.

6 O'Connor, R. J., British J. exp. Pathol. 31 (1950), 390.

7 Warburg, O., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 66 (1910), 305.

8 Tiedemann, H., und Tiedemann, H., Z. Naturforschg. 9b (1954), 371.

9 Dickens, F., und Weil-Malherbe, H., Biochem. J. 30 (1936), 659.

10 Warburg, O., Wind, F., und Negelein, E., Klin. Wschr. 5 (1926), 829; Warburg, O., Stoffwechsel der Tumoren, S. 248, Berlin 1926.

11 Warburg, O., Science (Washington) 123 (1956), 309. Addendum von Dean Burk.

12 Sandford, K. K., Likely, G. D., und Earle, W. R., J. nat. Cancer Inst. 15 (1954), 215.

13 Warburg, O., Kubowitz, F., und Christian, W., Biochem. Z. 242 (1931), 170.

59 Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Die latente Gärungskomponente, die im Stoffwechsel aller normalen Körperzellen enthalten ist, wird wegen der Entkoppelung der Atmung manifest, wenn man die Körperzellen aus Serum in Ringerlösung überträgt. So entstand der Irrtum vom anaeroben Leben und Wachstum der normalen Körperzellen. Im folgenden wird gezeigt, daß bei sachgemäßer Manometrie in Serum die Gärungskomponente der normalen Körperzellen ebenso latent bleibt wie im Leben.

Da die Arsenverbindungen zu den gefährlichsten Carcinogenen[1] gehören, ist ihre Wirkung auf die Energieproduktion der normalen Körperzellen von besonderem Interesse. Ein manometrischer Versuch mit embryonalen Zellen ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Zellen waren mit 5 Vol.-% CO_2 in Sauerstoff gesättigt. War das Medium, in dem die Zellen suspendiert waren, Serum (Kurve I), so er-

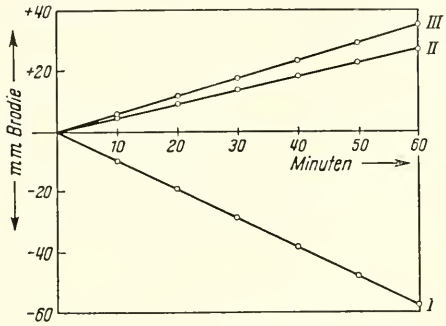


Abb. 1. Wirkung von As_2O_3 auf embryonale Zellen. Je 10 mg Mäusechorion (Trockengewicht) in Mäuseserum oder Ringerlösung. 5 Vol.-Prozent CO_2—O_2. 38°. v = 23,3. $v_F \sim 7{,}0$ cm³. I: In Serum, ohne As_2O_3, II: In Ringerlösung, ohne As_2O_3, III: In 10^{-3}-*m*. As_2O_3-Serum.

zeugten die embryonalen Zellen negative Drucke, da sie aerob nur atmen aber nicht gären[2]. War das Medium Ringerlösung (Kurve II), so erzeugten die Zellen positive Drucke, da Ringerlösung die Atmung entkoppelt und dadurch aerobe Gärung erzeugt. War das Medium Serum + 10^{-3}-*m*. arsenige Säure (Kurve III), so erzeugten die Zellen positive Drucke, da die arsenige Säure die Atmung zum Teil

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 12a (1957): 115.

Zusatz 1961. Während des Krieges ist in vielen Ländern behauptet und durch falsche Versuche begründet worden, daß der normale Stoffwechsel, insbesondere der embryonale Stoffwechsel, ein Gärungsstoffwechsel sei und daß die embryonale Entwicklung der höheren Lebewesen ein anaerobiotischer Vorgang sei, womit natürlich die Gärung der Tumoren eine bedeutungslose Erscheinung wurde. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Wissenschaft wieder auf den Boden der Tatsachen zurückzuführen und dem im Krieg entthronten Sauerstoff wieder den ihm zukommenden Platz anzuweisen. Wie es eine Wiederentdeckung auf dem Gebiet der Photosynthese gab — die Wiederentdeckung des großen Energieumsatzes — so gibt es auch hier nach dem Krieg eine Wiederentdeckung, die Wiederentdeckung der Funktion des Sauerstoffs im Leben der höheren Organismen.

hemmt, zum Teil entkoppelt, und dadurch aerobe Gärung erzeugt. Diese Wirkung des Arsens auf die Energieproduktion der Körperzellen kann man jedoch, wie die Abb. 1 zeigt, nur finden, wenn das Medium, in dem die Zellen suspendiert sind, Serum ist. Ist das Medium Ringerlösung oder irgendeine andere Salzlösung und setzt man das Arsen zu den Salzlösungen, so wird man die Wirkung des Arsens auf die Energieproduktion übersehen, da das Arsen eine zum größten Teil entkoppelte Atmung vorfindet.

Der Versuch zeigt, daß Salzlösungen als Medien bei der Manometrie der Körperzellen nicht benutzt werden dürfen, wenn Fragen der Carcinogenese oder der

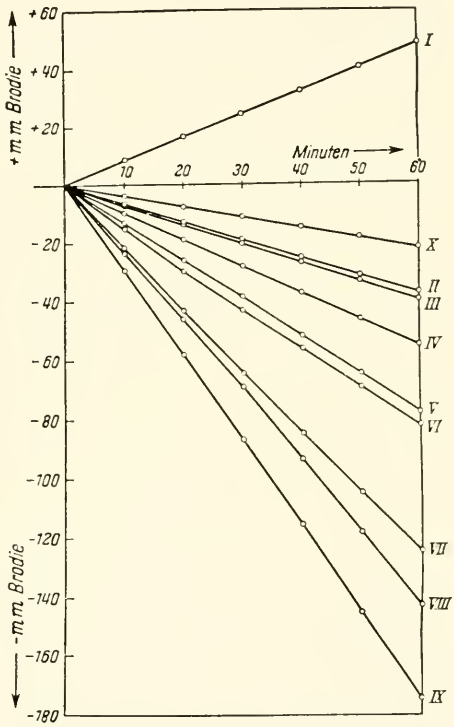


Abb. 2. Kleines Gefäß. $v = 16{,}1$ cm³; $v_F \sim 7$ cm³. Krebszellen und normale Körperzellen in homologem, mit Milchsäure angereichertem Serum. Je 10 mg Zellen (Trockengewicht). 38⁰. 5 Vol.-Prozent CO_2—O_2.
I. Mäuseascites-Krebszellen. II. Rattengehirn (Mark). III. Mäuse-Uterus (nicht geschnitten). IV. Ratten-Niere (Mark)*. V. Ratten-Milz. VI. Ratten-Gehirn (Rinde). VII. Mäuse-Chorion. VIII. Ratten-Leber. IX. Ratten-Niere (Rinde + Mark). X. Ratten-Netzhaut.

Chemotherapie untersucht werden sollen. In der Tat sollte man heute Versuche, bei denen Salzlösungen als Medien benutzt worden sind, als nicht mehr zeitgemäß streichen in allen Fällen, in denen die Energieproduktion zur Diskussion steht.

Bei den Versuchen mit Serum hat sich gezeigt, daß es nicht gleichgültig ist, ob man homologes oder heterologes Serum benutzt, auch wenn man das Serum vorher durch Erwärmen auf 57⁰ inaktiviert. Man wird deshalb immer homologes Serum benutzen. Es hat sich ferner gezeigt, daß es zweckmäßig ist, dem Serum L(+) Milchsäure zuzusetzen, weil die kleine Milchsäurekonzentration des normalen Serums, die im strömenden Blut konstant gehalten wird, im Verlauf eines mano-

* *Zusatz 1961.* Zu der Kurve IV (Rattenniere Mark) vergleiche man den Zusatz 1961 in Beitrag 58.

metrischen Versuchs schnell verbraucht wird und weil dann die Atmung derjenigen Zellen sinkt, deren Atmungs-Substrat Milchsäure ist.

Berücksichtigt man dies, so wird man bei der Manometrie intakter normaler Körperzellen ebensowenig aerobe Gärung finden wie im lebenden Tier. Natürlich ist die Milchsäurebestimmung im strömenden Blut lebender Tiere die entscheidende Methode; aber man kann nunmehr die Manometrie der Gewebeschnitte, mit der so viel entdeckt worden ist, auch zur Untersuchung der Energieproduktion benutzen, wenn man die hier beschriebenen Bedingungen einhält und die hier untersuchten Versuchsobjekte benutzt.

Zum Beleg des Gesagten sind in den Abb. 2 und 3 einige Versuche graphisch dargestellt, bei denen das Serum homolog und mit L(+) Milchsäure angereichert war. Die Versuche der beiden Abbildungen sind gleichzeitig, mit aliquotem Zell-

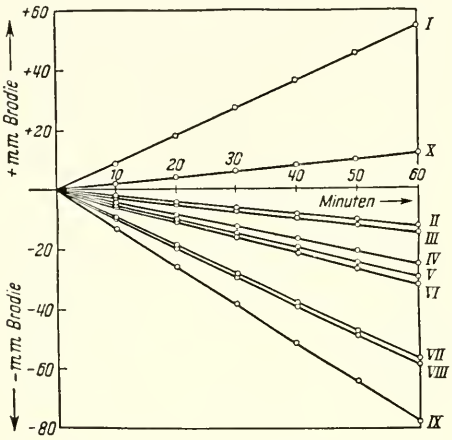


Abb. 3. Großes Gefäß. $v = 23{,}34$ cm³; $v_F \sim 7$ cm³. Im übrigen alles wie in Abb. 2. Je 10 mg Gewebe (Trockengewicht).

material, in verschieden großen Gefäßen ausgeführt worden, so daß man aus den korrespondierenden Drucken, mit den Formeln der 2-Gefäßmethode, die Atmung und die Gärung berechnen kann. Die Ergebnisse der Rechnung sind in der Tab. 1 zusammengestellt. In dem kleinen Gefäß (Abb. 2) erzeugen nur die Krebszellen positive Drucke. Alle andern Gewebe erzeugen negative Drucke; und zwar erzeugen die embryonalen Zellen, die in erster Linie mit den Krebszellen zu vergleichen sind, sehr erhebliche negative Drucke. In dem großen Gefäß (Abb. 3) erzeugen die Krebszellen positive Drucke; von den normalen Geweben erzeugt die Netzhaut geringe positive Drucke, während alle übrigen normalen Gewebe negative Drucke erzeugen.

Für viele Zwecke ist eine Berechnung der Atmung und Gärung nicht notwendig, sondern man kann sich mit der Feststellung begnügen, ob positive oder negative Drucke entstehen und ob irgendeine zugesetzte Substanz positive Druckänderungen in negative umschaltet. Mit einfachen Kegelgefäßen (ohne Einsätze) kann man so in großen Versuchsserien feststellen, ob eine Substanz auf die Energieproduktion wirkt und in welcher Richtung sie wirkt.

Es bleibt von allen normalen intakten Geweben nur *eine* Ausnahme bei der Manometrie übrig, die Netzhaut. Bringt man aber die Netzhaut, die man schnell

Nr.	Zellart	Kleines Gefäß (mm)	Großes Gefäß (mm)	Retention	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$Q_M^{O_2}$
I	Mäuse-Ascites-Krebszellen $v'_F = v_F = 7{,}15$ cm³	30′ + 24,5 60′ + 48,5	30′ + 27 60′ + 54	1,0 (Milchsäure)	— 6,1	+ 27,4	*21,3*
II	Rattengehirn (Mark) $v'_F = v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 19 60′ — 36,5	30′ — 6,4 60′ — 12,8	0,67 (CO_2)	— 5,9	+ 7,2	+ *1,3*
III	Mäuse-Uterus (gravid) $v'_F = v_F = 7{,}15$ cm³	30′ — 19,3 60′ — 39	30′ — 7,2 60′ — 15	0,49 (CO_2)	— 6,6	+ 6,9	+ *0,3*
IV	Rattenniere (Mark) $v'_F = v_F = 7{,}5$ cm³	30′ — 28,2 60′ — 54,4	30′ — 12,8 60′ — 25,6	0,84 (CO_2)	— 5,9	+ 4,3	*0*
V	Rattenmilz $v'_F = v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 38 60′ — 77,5	30′ — 15,8 60′ — 32,8	0,87 (CO_2)	— 9,7	+ 9,7	*0*
VI	Rattengehirn (Rinde) $v'_F = v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 43 60′ — 82	30′ — 15,3 60′ — 30	0,79 (CO_2)	— 12,3	+ 14,7	+ *2,4*
VII	Mäuse-Chorion $v'_F = v_F = 7{,}15$ cm³	30′ — 64,5 60′ — 124,5	30′ — 28,5 60′ — 57,5	0,50 (CO_2)	— 15,3	+ 12,4	*0*
VIII	Rattenleber $v'_F \times v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 68,5 60′ — 142,5	30′ — 28,6 60′ — 59,4	0,71 (CO_2)	— 18,7	+ 18,3	*0*
IX	Rattenniere (Rinde + Mark) $v'_F = v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 86,7 60′ — 174,5	30′ — 37,6 60′ — 79	0,80 (CO_2)	— 20,2	+ 17,1	*0*
X	Rattennetzhaut $v'_F = v_F = 7{,}35$ cm³	30′ — 10,3 60′ — 21,6	30′ + 5,8 60′ + 12	0,92 (Mittel von CO_2 und Milchsäure)	— 10,5	+ 23,5	+ *13*

Tab. 1. Zahlenwerte zu den Abb. 2 und 3. 38°; 5 Vol.-Prozent. CO_2—O_2. $v' = 16{,}1$ cm³; $v = 23{,}34$ cm³. Je 10 mg Gewebe (Trockengewicht).

präpariert, sofort in homologes, mit L(+) Milchsäure angereichertes Serum, so beträgt die aerobe Gärung nur $^1/_3$ bis $^1/_4$ des Wertes, den wir früher in Ringerlösung gefunden haben; was wiederum dafür spricht, ebenso wie das Fehlen der aeroben Gärung der Kaltblüter-Netzhaut, daß die aerobe Gärung der Warmblüternetzhaut ein „artefact" ist. Noch immer fehlt jedoch der entscheidende Versuch, die Punktion der Vena ophthalmica.

Dagegen gehören die kernlosen roten Blutzellen[3] nicht zu den Ausnahmen. In den roten Blutzellen tritt die aerobe Gärung nur dann auf, wenn sie mit ihren Kernen ihre Atmung verlieren; während die kernhaltigen roten Vogelblutzellen im Kreislauf ihren Kern behalten und deshalb keine aerobe Gärung zeigen.

Methodische Anmerkungen

1. Für jeden Versuch waren etwa 35 cm³ Serum notwendig, nämlich 3mal 7 cm³ für die anaerobe und die beiden aeroben Messungen und 2mal 7 cm³ für die Messung der Retention der Kohlensäure und der Milchsäure. Diese großen Mengen Mäuseserum erhält man leicht von Ascites-Mäusen. Rattenserum wurde von normalen Ratten gewonnen. Der Ascites wurde ohne Zusatz

von Heparin entnommen und zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde 10 Min. auf 57° erhitzt und nochmals zentrifugiert. Es gerinnt nach dieser Behandlung nicht. Dem Rattenblut wurde 0,05 mg Heparin pro cm^3 zugesetzt. Dann wurde zentrifugiert, 10 Min. auf 57° erhitzt und wieder zentrifugiert.

Ascites-Serum enthält fast keinen Zucker, aber etwa 2 mg L(—) milchsaures Natrium pro cm^3. 2 mg Glucose pro cm^3 wurden immer zugesetzt. Dem Rattenserum, das nur wenig Milchsäure enthält, wurden 2 mg L(—) milchsaures Natrium pro cm^3 zugesetzt, aber kein Zucker. Der Bicarbonatgehalt wurde auf etwa 350 mm^3 Bicarbonatkohlensäure pro cm^3 justiert

2. Die Retention[1] wurde immer direkt für diejenige Menge Serum bestimmt, die im Versuch angewandt wurde, in unserem Fall also für 7 cm^3 Serum, in Kästchen von der gleichen Größe wie die Versuchs-Gefäße. Bei der Bestimmung der Retention R der Kohlensäure wurde der gewünschte CO_2-Druck erzeugt, indem in einer siamesischen Birne Bicarbonat zu Schwefelsäure gegeben wurde. Zur Bestimmung der Retention R der Milchsäure wurde Säure aus einer einfachen Birne in den Hauptraum gegeben. Die Dimension von R ist $\frac{mm^3\ CO_2}{mm\ Brodie}$, so daß

$$k^{R}_{CO_2}\left[= k_{CO_2} + R\right].$$

3. Ob eine atmende Zelle bei der manometrischen Anordnung positive oder negative Drucke erzeugt, hängt von dem Wert und dem Vorzeichen von γ ab, wie man erkennt, wenn man die Formeln der 1-Gefäßmethode betrachtet

$$x_{O_2} = H \cdot K_{O_2}, \qquad [1]$$

$$K_{O_2} = \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma \cdot k_{O_2}}. \qquad [2]$$

Ist γ negativ und so groß, daß $k_{CO_2} + \gamma \cdot k_{O_2}$ negativ wird, so wird K_{O_2} negativ und deshalb H positiv, da die Atmung x_{O_2} immer negativ sein muß.

Literatur

1 Vgl. z. B. F. Roth, Z. Krebsforsch. 61 (1956), 287.

2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A. W., diese Z. 11b (1956), 657.

3 Stoffwechsel der roten Blutzellen vgl. O. Warburg, Hoppe-Seylers. Z. physiol. Chem. 59 (1909), 112; 70 (1910), 413. Warburg, O., Kubowitz, F., und Christian, W., Biochem. Z. 242 (1931), 170.

4 Warburg, O., diese Z. 9b (1954), 302.

60 Über die Wirkung von Wasserstoffperoxyd auf Krebszellen und auf embryonale Zellen*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Die Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen zeigt, daß Krebszellen, als partielle Anaerobier, viel weniger Katalase enthalten als embryonale Zellen. Die Möglichkeit einer Anwendung auf die Wirkung der Röntgenstrahlen wird diskutiert.

Züchtet man Lactobazillen anaerob, so verlieren sie von der Kette der Atmungsfermente zunächst ihre Eisenfermente, Eisenoxygenase, Katalase, Peroxydase. Bringt man solche Zellen in Berührung mit Sauerstoff, so übertragen sie Sauerstoff mit ihren gelben Fermenten und produzieren dabei H_2O_2, das sie tötet. Setzt man jedoch Katalase zu den Zellen, so wird das gebildete H_2O_2 schnell zerstört, und die Zellen bleiben auch bei Berührung mit Sauerstoff am Leben[1].

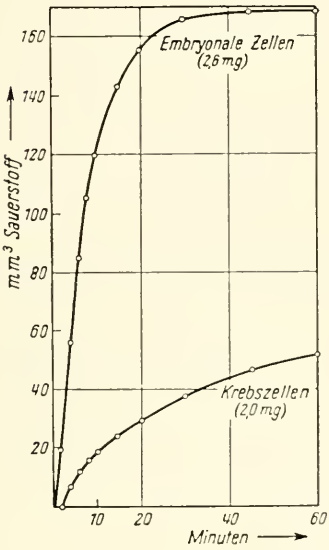


Abb. 1. Zersetzung von $n/200$-H_2O_2 durch embryonale Zellen oder Krebszellen. Beide Zellarten waren in inaktiviertem Mäuse-Ascites-Krebs-Serum suspendiert. Temperatur 38°. Gasraum 5% CO_2-Luft. Daten im Protokoll.

Krebszellen, als partielle Anaerobier, haben ihre Eisenfermente z. T. verloren. Sie haben erheblich weniger Katalase als embryonale Zellen und sind deshalb gegenüber Sauerstoff empfindlicher als embryonale Zellen. Es ist eine Erfahrung unseres Instituts, daß bei längeren manometrischen Versuchen mit Krebszellen der Sauerstoffdruck nicht 1 Atmosphäre, sondern nur $^1/_5$ Atmosphäre betragen darf; während unter sonst gleichen Bedingungen 1 Atmosphäre Sauerstoff von den embryonalen Zellen ohne Schädigung vertragen wird[2].

Wir beschreiben im folgenden Versuche über die verschiedene Empfindlichkeit von Krebszellen und embryonalen Zellen gegenüber H_2O_2, die in Serum mit der kürzlich beschriebenen manometrischen Versuchsanordnung ausgeführt wurden[3]. Es zeigte sich, daß embryonale Zellen H_2O_2 viel schneller zersetzen als Krebszellen, anfangs etwa 10mal so schnell, wenn die Temperatur 38° beträgt. Ist die Anfangskonzentration des H_2O_2 1/200-normal (Abb. 1), so haben nach 60 Minuten die embryonalen Zellen das H_2O_2 vollständig zer-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 12b (1957): 393.

Zusatz 1961. Dies war die Pionierarbeit auf dem Gebiet der selektiven Wirkung der Röntgenstrahlen auf Krebszellen. Später (vergl. Beitrag 82) ist die Versuchsanordnung noch dadurch verbessert worden, daß wir auch als embryonale Zellen Einzelzellen verwendeten, wodurch die Diffusionsverhältnisse für die Krebszellen und die embryonalen Zellen gleichartiger gestaltet wurden.

setzt, während die Krebszellen nur 30% des berechneten Sauerstoffs entwickelt haben. Der nicht entwickelte Sauerstoff ist dann zum größten Teil noch in der Krebszellen-Suspension enthalten, wie man durch Titration mit Permanganat (nach Trichloressigsäure-Fällung) oder durch Zusatz von Katalase nachweisen kann. Nur ein kleiner Teil des zugesetzten H_2O_2 ist also durch Reaktion mit den Zellen verbraucht worden.

Dieser kleine Teil ist es, der in der 1stündigen Versuchszeit den Stoffwechsel der Krebszellen größtenteils vernichtet und der bewirkt, daß die Zellen nach der 1stündigen Versuchszeit nicht mehr transplantierbar sind; während unter sonst gleichen Bedingungen das H_2O_2 den embryonalen Zellen nicht zu schaden scheint, da nach der 1stündigen Versuchszeit der Stoffwechsel fast vollständig erhalten war. Zum Beispiel bewirkte die Anfangskonzentration 1/1000-*n*. H_2O_2 nach 1 Stunde bei 38° (in Ascitesserum), daß die folgenden Stoffwechselgrößen erhalten wurden:

Embryonale Zellen

	ohne H_2O_2	$+ H_2O_2$
Atmung	$Q_{O_2} = -15$	$Q_{O_2} = -14$
Aerobe Gärung	$Q_M^{O_2} = 0$	$Q_M^{O_2} = 0$
Anaerobe Gärung	$Q_M^{N_2} = +24$	$Q_M^{N_2} = +24$

Krebszellen

	ohne H_2O_2	$+ H_2O_2$
Atmung	$Q_{O_2} = -7$	$Q_{O_2} = -2$
Aerobe Gärung	$Q_M^{O_2} = +18$	$Q_M^{O_2} = 0$
Anaerobe Gärung	$Q_M^{N_2} = +50$	$Q_M^{N_2} = +8$

Es machte dabei keinen Unterschied, ob das nicht zersetzte H_2O_2 aus der Krebszellen-Suspension vor der Messung des Stoffwechsels mit Katalase entfernt war oder nicht.

Obwohl die Krebszellen in vitro durch wenig H_2O_2 schnell getötet werden, kann man durch Einspritzen von H_2O_2 in lebende Tumortiere, z. B. in die Bauchhöhle von Asciteskrebs-Mäusen, therapeutisch nichts erreichen, da die Blutkatalase das H_2O_2 zu schnell zersetzt[4]. Nur wenn man H_2O_2 kontinuierlich in den Zellen in vivo erzeugen könnte, hätte man Aussicht auf Erfolg.

Anwendung auf die Wirkung der Röntgenstrahlen

Wie insbesondere Joseph Weiss[5] gezeigt hat, erzeugen Röntgenstrahlen in wäßrigen Medien, also auch in lebenden Zellen, H_2O_2 durch Kombination der primär gebildeten OH-Radikale oder durch Reduktion des molekularen Sauerstoffs durch primär gebildete H-Atome. Die Idee, daß die Krebszellen gegen Röntgenstrahlen deshalb empfindlicher sind als normale Zellen, weil sie weniger Katalase enthalten, erhält durch den Versuch der Abb. 1 eine bemerkenswerte experimentelle Stütze. Die Möglichkeit, Krebs durch Röntgenstrahlen zu heilen, wird so noch mehr als bisher[6] zurückgeführt auf den biochemischen Unterschied zwischen Krebszellen und embryonalen Zellen, d. h. auf die partielle Anaerobiose der Krebszellen.

Gegen die Idee spricht zunächst, daß die heilende Strahlendosis nicht diejenigen Konzentrationen an Wasserstoffperoxyd erzeugt, die notwendig sind, um Krebs-

zellen durch zugesetztes Wasserstoffperoxyd in vitro abzutöten. Doch muß man bedenken, daß Wasserstoffperoxyd in statu nascendi (z. B. HO_2) in den Zellen viel stärker wirken könnte als von außen zugesetztes Wasserstoffperoxyd; und daß die Katalase wahrscheinlich auch Wasserstoffperoxyd in statu nascendi zersetzt.

Für die Idee sprechen die Versuche von CRABTREE und CRAMER[7], die fanden, daß Röntgenstrahlen auf Krebszellen aerob viel stärker wirken als anaerob; und daß die aerobe Strahlenwirkung durch Blausäure sehr erheblich verstärkt wird. Diese Wirkung der Blausäure auf die Strahlenempfindlichkeit kann hier nur auf der Inaktivierung der Katalase oder der Peroxydase beruhen, nicht aber auf der Hemmung der Atmung, da Anaerobiose die Strahlenwirkung nicht steigert, sondern hemmt.

Versuchsanordnung

Zu den Vorschriften[3] über die Manometrie der Körperzellen ist hier lediglich hinzuzufügen, daß das aktive Ascitesserum besonders sorgfältig durch Waschen mit inaktiviertem Serum entfernt werden muß, da aktives Serum Katalase enthalten kann. 10 Minuten Erhitzen auf 57° zerstört die Blutkatalase.

Protokoll

H_2O_2-Zersetzung durch Ascites-Krebszellen und durch Chorion der Maus

Ascites-Krebszellen (= 2mg Trockensubstanz) wurden zentrifugiert, 2mal mit inaktiviertem Ascites-Serum (10′ 57°) gewaschen und auf 3 cm³ mit inaktiviertem Ascites-Serum aufgefüllt.

Chorion von Mäuseembryonen wurde 2mal mit inaktiviertem Ascites-Serum gewaschen und dann in 3 cm³ inaktiviertem Ascites-Serum suspendiert. Gewicht pro Gefäß 2,6 mg.

Anordnung: Glucose wurde nicht zugesetzt. Von der mit $KMnO_4$ titrierten H_2O_2-Lösung wurden 0,2 cm³ = 15,5 *μMole* in die Ansatzbirne eines Manometriekegels gegeben, dessen Hauptraum die Zellen, suspendiert in 3 cm³ inaktiviertem Ascites-Serum, enthielt. Der Gasraum enthielt 5% CO_2-Luft. Die Temperatur war 38°. Die folgenden Druckänderungen wurden nach Zugabe des H_2O_2 erhalten:

(Min.)	Chorion		Krebszellen	
	— (mm)	+ H_2O_2 (mm)	— (mm)	+ H_2O_2 (mm)
2	0	+ 14	—0,5	0
4	0	+ 40	+0,5	+ 4,5
6	— 0,5	+ 61,5	0	+ 8,5
8	— 0,5	+ 76,5	0	+11,5
10	— 1,0	+ 87,0	—0,5	+13,5
15	— 2,5	+103,5	—0,5	+17,0
20	— 3,5	+112,5	—2,0	+21,0
30	— 5,5	+120,0	—1,5	+27,0
45	— 9,0	+121,5	—4,0	+33,5
60	—12,5	+121,5	—6,0	+37,0
	X_{O_2} = 121,5 · 1,38 = 168 mm³ = 7,5 μ Mole O_2, während 15,5 μMole H_2O_2 = 7,75 μ Mole O_2 zugegeben worden waren. Ausbeute an O_2 = 97 Prozent.		X_{O_2} = 37 · 1,39 = 51,5 mm³ = 2,3 μ Mole O_2, während 15,5 μMole H_2O_2 = 7,75 μ Mole O_2 zugegeben worden waren. Ausbeute an O_2 = 30 Prozent.	

Tab. 1. Beobachtete Druckänderungen bei Zusatz von H_2O_2

Zur Messung des Stoffwechsels so vorbehandelter Zellen wurden 2 mg Glucose/cm^3 zugesetzt. Milchsäure wurde zur Stoffwechselmessung nicht zugesetzt, da Asciteskrebs-Serum viel Milchsäure enthält.

Literatur

1 Der Schutz der Anaerobier gegenüber Sauerstoff durch Zusatz von Katalase ist 1924 im Rockefeller-Institute in New York von O. T. Avery entdeckt worden [J. exp. Medicine 39 (1924), 275, 347, 357]. Der chemische Mechanismus der H_2O_2-Bildung in den Anaerobiern durch die Reoxydation der gelben Fermente ist 1933 in Dahlem entdeckt worden [Biochem. Z. 260 (1933), 499; 266 (1933), 377].

2 Vgl. dazu auch O. Warburg, Arch. Geschwulstforsch. 6 (1953), 7.

3 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforschg. 12b (1957), 115.

4 Vgl. aber R. A. Holman, Nature (London) 179 (1957), 1033.

5 Weiss, J., Nature (London) 153 (1944), 748; vgl. auch W. M. Dale, Nature (London) 151 (1943), 280.

6 Warburg, O., Science (Washington) 123 (1956), 309.

7 Crabtree, H. G., und Cramer, W., Imp. Cancer Res. Fund 10 (1932), 33, 95; 11 (1933), 75, 89, 103; vgl. auch A. Forssberg, Nature (London) 159 (1947), 308; L. H. Gray, Nature (London) 179 (1957), 991.

61 Über die Entstehung des Krebsstoffwechsels in der Gewebekultur*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Unter den Bedingungen der „Monolayer Tissue Culture" in nicht bewegten Züchtungsflaschen entsteht in Nierenzellen aus dem normalen Stoffwechsel der Krebsstoffwechsel im Lauf einiger Wochen. Diese Tatsache ändert unsere Auffassung von der Entstehung der Krebszellen wesentlich.

Da die Gewebekultur carcinogen ist[1] und da man mit den neuen Methoden der Gewebekultur physiologisch einheitliches Zellmaterial in beliebig großen Mengen züchten kann, so ist es nunmehr möglich, den Stoffwechsel der bei der Gewebekultur entstehenden Zellen mit der gleichen methodischen Sicherheit manometrisch zu messen wie etwa den Stoffwechsel der Hefezellen[1].

Unser Ausgangsmaterial waren Kaninchen-Nieren, die durch Behandlung mit Trypsin nach Dulbecco-Vogt in Einzelzellen aufgeteilt und dann nach einer Vorschrift von L. Grützner (Institut Robert Koch, Berlin) im Brutschrank gezüchtet wurden. Direkt nach der Aufteilung in Einzelzellen wurde zunächst der normale Nierenstoffwechsel gefunden, d. h. eine geringe anaerobe und gar keine aerobe Gärung. Wurde dann im Brutschrank gezüchtet, so entwickelte sich — allmählich — im Lauf von 1 bis 2 Wochen der typische Krebszellen-Stoffwechsel, d. h. eine große anaerobe und eine erhebliche aerobe Gärung. Bei der Anlegung jeder Subkultur schien diese Gärung wieder zu sinken und dann, wie bei der ersten Kultur, wieder zu steigen.

Unsere bisherige Auffassung, daß die Gärung der Krebszellen im Lauf von Jahren durch Selektion aus der latenten Gärungskomponente der normalen Zellen entstehe, muß also dahin geändert werden, daß die große Gärung unter unnatürlichen Wachstumsbedingungen *sehr schnell* entstehen kann. Die lange Latenzzeit bei der Krebsentstehung ist dann vielleicht die Zeit, in der ein zunächst reversibler Gärungsanstieg irreversibel wird.

Gärung scheinbar normaler Zellen ist von uns bereits vor vielen Jahren[2] in Fibroblasten gefunden worden, die mit der alten Carrel-Methode gezüchtet worden waren. Da beim normalen Wachstum im Körper eine solche Gärung nicht auftritt, wäre es schon damals konsequent gewesen, zu schließen, daß die Gewebekultur carcinogen ist. Doch war das nach Carrel gezüchtete Zellmaterial physiologisch so uneinheitlich, und die Entstehung von Krebszellen aus normalen Zellen in vitro war damals so unwahrscheinlich, daß es niemand wagen konnte, aus unsern Messungen die Carcinogenität der Gewebekultur zu folgern.

1. Die Züchtung der Zellen

Nierenzellen von Kaninchen wurden nach einer Vorschrift von Dr. Liselotte Grützner, Virusabteilung des Instituts Robert Koch in Berlin, gezüchtet. Die Methode ist aus Methoden von Dulbecco und Vogt[3] und von Youngner[4] ent-

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 61.

wickelt worden und wird von Frau Dr. GRÜTZNER folgendermaßen beschrieben[5]: „Die Gewebefragmente werden durch Vorbehandlung mit einer 0,25proz. Trypsinlösung in Einzelzellen zerlegt, die dann im flüssigen Nährmedium aufgeschwemmt und in Flaschen einpipettiert werden. Sie nehmen Kontakt mit der Glaswand und bilden auf dieser durch Vermehrung eine dichte Membran, die nach Behandlung mit Versenlösung (0,02%) sich in eine Zellsuspension auflöst und als solche nach Fortwaschen des Versens in neue Gefäße übertragen wird („Subkultur"), um hier wieder zu einer gleichmäßigen Membran auszuwachsen. Versen hat sich als oberflächenentspannendes Mittel zur Auflösung von Zellmembranen in Einzelzellen gut bewährt."

Als Züchtungsgefäße verwendeten wir Flaschen nach ROUX von 1200 cm^3 Inhalt, in die die Impfzellen, suspendiert in 70 cm^3 Nährlösung, gegeben wurden. Die Nährlösung war Hanksche Salzlösung[6], der pro *l* 1 g Glucose, 5 g Lactalbumin-Hydrolysat der Firma Nordwald-Hamburg, 1 g Hefeextrakt der Firma Nordwald-Hamburg, 1,0 g Natriumbicarbonat und 20 cm^3 inaktiviertes Kälberserum zugesetzt worden waren. Der Gasraum der Züchtungsgefäße enthielt 5 Vol.-% CO_2 und 95 Vol.-% Luft. Die Züchtungsgefäße wurden im Brutschrank *nicht* bewegt.

2. Messung des Stoffwechsels

Der Stoffwechsel der Nierenzellen wurde manometrisch mit der 2-Gefäßmethode, wie kürzlich beschrieben[7], gemessen. Die Zellen wurden zu dem Zweck mit Salz-Lösung, der 0,02% Versen zugesetzt war, vom Glas abgelöst und in Einzelzellen zerteilt, dann auf der Zentrifuge bei 650 g zentrifugiert, in Züchtungsmedium (vgl. vorigen Abschnitt) oder in inaktiviertem Mäuse-Asciteskrebsserum suspendiert und in die Manometriegefäße pipettiert. L-(+)-Milchsäure wurde für die Zwecke der Manometrie dem Züchtungsmedium (2 mg pro cm^3) zugesetzt, während ein Zusatz von Milchsäure zu Ascitesserum, wegen des Eigengehalts an Milchsäure, nicht notwendig war. Zuerst wurde immer der aerobe Stoffwechsel gemessen. Dann wurde 5 Vol.-% CO_2-Luft durch 5 Vol.-% CO_2-Argon ersetzt, und es wurde der anaerobe Stoffwechsel gemessen.

Die Temperatur bei der Messung war 37°. Die Volumina des Gefäßpaares waren 16,10 cm^3 und 23,34 cm^3, das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit betrug 7,15 cm^3. Bei diesen Abmessungen erzeugen alle normalen Zellen, wachsende oder nicht wachsende, außer der Retina, in beiden Gefäßen negative Drucke, während die Krebszellen in beiden Gefäßen positive Drucke erzeugen[7].

Negative Drucke in beiden Gefäßen erzeugen auch die normalen Leukocyten des Blutes, von denen noch immer in der Literatur behauptet wird, daß sie „Krebsstoffwechsel" haben. Wir verhindern die Gerinnung des Blutes mit Na_3-Citrat, zentrifugieren die roten Blutzellen vorsichtig heraus und bringen dann die Suspension der weißen Zellen, ohne sie zu zentrifugieren, in das Paar der Manometriegefäße. Vogelblut ist besonders geeignet, da hier die Schwierigkeit der Abtrennung der Thrombocyten fortfällt. Die veralteten Methoden, die Zellen in „Krebs-Ringer" zu suspendieren und bei der Manometrie Kalilauge im Einsatz zu verwenden (vgl. F. SEELICH, Z. f. Krebsforschung 62 [1952] 1) sind gänzlich zu vermeiden, da man hierbei den Stoffwechsel bei dem Kohlensäuredruck Null, also bei unphysiologischen Bedingungen, mißt.

3. Graphische Darstellung einiger Versuche

Abb. 1 soll zeigen, daß die anaerobe Gärung der Nierenzellen im Lauf von etwa 2 Wochen Gewebekultur von einem sehr niedrigen Wert auf den fast 10fachen Wert steigt und mit $Q = +35$ einen Gärungswert erreicht, der für Tumorzellen mittlerer Virulenz charakteristisch ist.

Abb. 2 soll zeigen, daß die Nierenzellen in dem Züchtungsmedium nach 0 Tagen Kultur, so wie alle normalen Zellen, in beiden Gefäßen negative Drucke geben; daß sie aber nach 16 Tagen Kultur, so wie Krebszellen, in beiden Gefäßen positive Drucke geben. Die Umkehr des Vorzeichens der Drucke rührt daher, daß die aerobe Gärung der frischen Nierenzellen 0 ist, während die aerobe Gärung 16 Tage kultivierter Nierenzellen den beträchtlichen Wert von +15 hat.

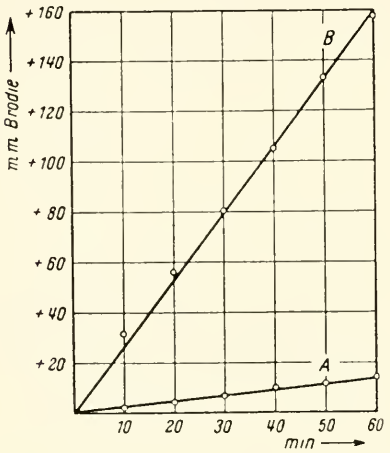


Abb. 1. Anaerobe Bedingungen. Je 10 mg Zellen (trocken) pro Gefäß
A: Nierenzellen nach 0 Tagen Kultur, $Q_M^{Argon} = +3$
B: Nierenzellen nach 16 Tagen Kultur, $Q_M^{Argon} = +35$

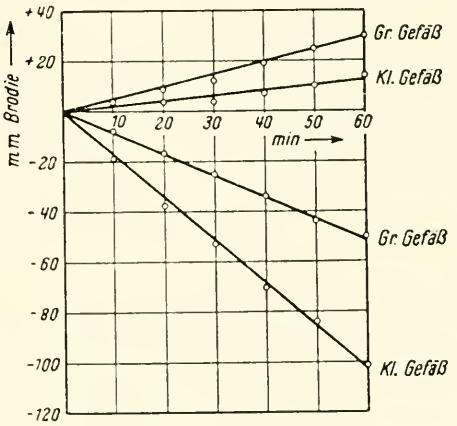


Abb. 2. Aerobe Bedingungen. Je 10 mg Zellen (trocken) pro Gefäß. Negative Drucke: Nierenzellen nach 0 Tagen Kultur. $Q_{O_2} = -12$ $Q_M^{O_2} = 0$, Positive Drucke: Nierenzellen nach 16 Tagen Kultur. $Q_{O_2} = -7$ $Q_M^{O_2} = +15$

Beide Abbildungen zeigen, daß die Änderung des Stoffwechsels der Nierenzellen bei der Züchtung außerhalb des Körpers nicht geringfügig ist, sondern tiefgreifend und außerhalb aller möglichen experimentellen Fehler.

4. Die Stoffwechselquotienten

Die Tab. 1 soll zeigen, daß sich die Stoffwechselquotienten bei der Züchtung in kurzen Zeiten ändern; daß die aerobe Gärung für die aus dem Körper entnommenen Zellen immer Null ist und nach wenigen Tagen auf beträchtliche Werte steigt und daß die anaerobe Gärung der aus dem Körper entnommenen Zellen etwa 3 ist und im Lauf der Züchtung auf Werte von 30, sogar 40 und 50 steigt.

Bildet man das Mittel aller Atmungswerte der frischen Zellen und das Mittel aller Atmungswerte der kultivierten Zellen, so erhält man für die frischen Zellen

Kultur		Kulturdauer (Tage)	Atmung [Q_{O_2}]	Aerobe Gärung [$Q_M^{O_2}$]	Anaerobe Gärung [Q_M^{Argon}]
A		0	—11,4	0	+ 3,0
A		1	— 6,8	0	+ 3,0
A		1	— 8,1	0	+ 3,5
A		6	— 8,3	+ 4,8	+ 35,0
A		7	—10,3	+ 10	+ *46,0*
A		10	—	—	+ 30,0
A		13	— 2,1	+ 9	+ 17,0
A	1. Subkultur	4	— 8,1	+ 14	+ 12,0
A	1. Subkultur	10	— 3,5	+ 10	+ 29,0
B	Neue Kultur	0	—11,5	0	+ 4,7
B	1. Subkultur	6	— 7,0	+ 15,1	+ 35,0
B	1. Subkultur	16	— 3,8	+ 22	+ 56,0
B	2. Subkultur	7	— 7,4	+ 10	+ 28,0
C	Neue Kultur	1	— 7,0	0	+ 2,2
C		12	—13	+ 10	+ 21,0
C		18	— 1	+ 8	+ 31,0
C	1. Subkultur	6	— 4	+ 20	+ 25,0
D	Neue Kultur	0	—11	0	+ 3,5
E	Neue Kultur	0	—10	0	+ 2,4

Tab. 1. Änderung des Stoffwechsels im Lauf der Zucht

$Q_{O_2} = -11$ und für die kultivierten Zellen $Q_{O_2} = -6{,}5$. Man beachte ferner, daß beim Übergang zu Subkulturen der Stoffwechsel zunächst wieder in der Richtung des normalen zurückgeht, so daß also der Krebsstoffwechsel nach Wochen z. T. noch reversibel zu sein scheint.

Über die Ursachen der Entstehung des Krebsstoffwechsels können wir noch nichts sagen. Vielleicht spielt die chemische Zusammensetzung des Züchtungsmediums eine Rolle, vielleicht auch der niedrige Sauerstoffdruck, der sich in den ruhenden Gefäßen innerhalb der Zellschicht herausbilden muß.

Literatur

1 Warburg, O., Science (Washington) 123 (1956), 309. Addendum by Dean Burk.
2 Warburg, O., und Kubowitz, F., Biochem. Z. 189 (1927), 242.
3 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exp. Medicine 99 (1954), 167.
4 Youngner, J. S., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85 (1954), 202, 527.
5 Unveröffentlichtes Manuskript.
6 Hanks, J. H., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71 (1949), 196.
7 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforschg. 11b (1956), 657; 12b (1957), 115.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE, MASS. LIBRARY

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Der „Krebsstoffwechsel" der normalen weißen Blutzellen, der vielfach in der letzten Zeit, z. B. von W. Remmele und F. Seelich[1], gefunden wurde, ist ein Artefakt infolge mechanischer und chemischer Schädigungen.

Da in den weißen Blutzellen, ähnlich wie in anderen normalen Körperzellen[2], aerobe Gärung durch Entkopplung der Atmung erzeugt wird, wenn man die Zellen aus Blutplasma in Salzlösungen bringt, so darf bei der Manometrie der weißen Blutzellen nur Plasma (das mit 2 bis 5 Vol.-% CO_2-Luft gesättigt ist) verwendet werden. Es ist ferner bei der Gewinnung der weißen Blutzellen für manometrische Versuche ein Zusammenzentrifugieren zu vermeiden, da die empfindlichen Zellen dabei mechanisch geschädigt werden. Es ist außerdem zu beachten,

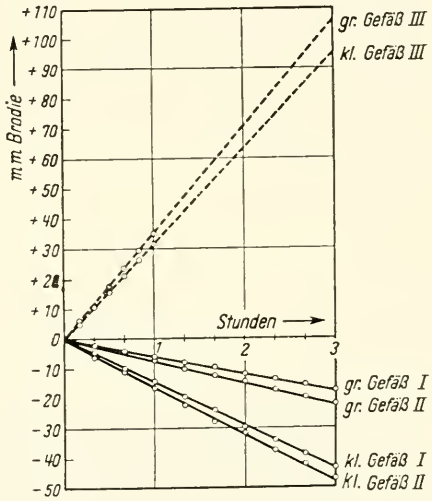


Abb. 1. Manometrie der weißen Blutzellen in Serum für je 6,44 mg Zellen (Trockengewicht). 38°. 5% CO_2-Luft. Kurven I: Weiße Menschenblut-Zellen $Q_{O_2} = -3{,}3$; $Q_{CO_2} = +3{,}3$; $Q_M^{O_2} = 0$. Kurven II: Weiße Hühnerblut-Zellen $Q_{O_2} = -2{,}8$; $Q_{CO_2} = -2{,}1$; $Q_M^{O_2} = 0$. Kurven III: Asciteskrebs-Zellen. $Q_{O_2} = -8$; $Q_{CO_2} = 33$; $Q_M^{O_2} = +25$. Kleines Gefäß V = 16,10 cm³, V_F = 7,35 cm³. Großes Gefäß V = 23,34 cm³, V_F = 7,35 cm³.

daß die weißen Blutzellen Abkühlung auf 0°, wie manche andere Körperzellen, ohne Schädigung nicht vertragen. Beachtet man dies, so wird man, wie die folgenden Versuche zeigen, niemals „Krebsstoffwechsel", sondern immer einen rein aeroben Stoffwechsel der normalen menschlichen weißen Blutzellen finden.

Menschenblut fließt direkt aus der Kanüle in ein Drittel des Blutvolumens einer Salzlösung, die 0,7 g NaCl und 1,1 g Na_3-citrat · 5 H_2O enthält und 0,9% NaCl

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958): 515.

Zusatz 1961. Das Problem des Stoffwechsels der weißen Blutzellen ist unseres Erachtens durch eine Arbeit von 1961 (vergl. Beitrag 74) vollständig gelöst worden. Dort wird gezeigt, daß die *wachsenden* weißen Blutzellen einen rein aeroben Stoffwechsel haben. Nur der Stoffwechsel *wachsender* Zellen aber ist von Bedeutung, wenn ein Vergleich mit den Krebszellen zur Diskussion steht. Ob der Stoffwechsel der leukämischen Leukozyten normal oder ein Krebsstoffwechsel ist, kann nur durch Untersuchung des leukämischen Knochenmarks entschieden werden.

etwa isoton ist. Wird dann einige Minuten bei 400 g zentrifugiert, so senken sich die roten Blutzellen schneller als die weißen, und man kann eine überstehende Flüssigkeit abheben, die fast nur weiße Blutzellen und Blutplättchen enthält. Wir pipettieren sie direkt in die Manometriegefäße und messen nach Zusatz von Glucose und Lactat ihren Stoffwechsel bei 38° und Sättigung mit 5% CO_2-Luft, wie früher beschrieben[2].

Abb. 1 ist die graphische Darstellung eines Versuches mit einigen mg Zellen. Wie man sieht, sind die manometrischen Ausschläge mehr als ausreichend und im Lauf einiger Stunden nahezu konstant. Die Druckänderungen sind für die *beiden* Gefäße der 2-Gefäß-Methode negativ, so wie für normale Körperzellen; während Krebszellen unter sonst gleichen Bedingungen *in denselben* Gefäßen positive Drucke* geben. Die beiden gestrichelten Linien im positiven Gebiet der Abb. 1 zeigen die manometrischen Ausschläge, die die weißen Blutzellen geben würden, wenn ihr Stoffwechsel „Krebsstoffwechsel" wäre.

Ebenso wie der in Abb. 1 beschriebene Versuch, wurden 5 Versuche mit weißen Blutzellen des Menschen ausgeführt.

Versuch Nr.	Q_{O_2}	Q_{CO_2} (Gesamt-CO_2)	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}
1	—3,3	+3,3	0	+10,3
2	—3,1	+3,2	0	+12,6
3	—3,0	+3,1	0	+12,4
4	—2,8	+2,6	0	+13
5	—1,7	+1,1	0	+10,6

Tab. 1. Stoffwechsel von Leukocyten des Menschen

Die Tab. 1 zeigt, daß in keinem Fall die Gesamt-CO_2 größer war als der O_2-Verbrauch, daß also Milchsäurebildung, falls eine solche vorhanden war, sehr klein war gegen den O_2-Verbrauch. Wieviel von diesem Stoffwechsel von den Blutplättchen herrührte, wurde geprüft, indem die weißen Blutzellen bei höherem g vollständig abzentrifugiert wurden und dann der Stoffwechsel in der darüber stehenden Flüssigkeit gemessen wurde, also der Stoffwechsel der Blutplättchen ohne Leukocyten. Es ergab sich, daß der Stoffwechsel nur einen kleinen Teil des Stoffwechsels der weißen Blutzellen ausmachte.

Vogelblut enthält nach den Angaben der Literatur keine Blutplättchen. Wurden die roten Blutzellen aus Hühnerplasma in gleicher Weise wie aus Menschenplasma durch fraktionierte Zentrifugierung abgetrennt und wurde dann der Stoffwechsel der überstehenden Flüssigkeit, die also keine Blutplättchen enthielt, gemessen, so wurde gemäß Abb. 1 der gleiche Stoffwechsel wie für das Gemisch von Leukocyten und Blutplättchen des Menschenblutes erhalten. Zum Beispiel waren die Stoffwechselquotienten für Hühnerleukocyten im Hühnercitratplasma:

$$Q_{O_2} = -2{,}8;\ Q_M^{O_2} = 0;\ Q_M^{Argon} = +6{,}7.$$

Literatur

1 Remmele, W., Acta Haematol. 23 (1955), 103; Seelich, F., Z. Krebsforsch. 62 (1957), 1.

2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A. W., Z. Naturforschg. 11b (1956), 657; 12b (1957), 115.

* Positive Drucke erzeugt der Stoffwechsel immer dann, wenn der numerische Wert von γ' (Gesamt-CO_2/O_2) größer als k_{CO_2}/k_{O_2} ist.

63 Katalasegehalt, Gärung und Atmung in der Zellkultur* nach Dulbecco-Vogt

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Die Entwicklung des Gärungsstoffwechsels bei der Kultur von Nierenzellen ist mit einem Absinken der Katalase auf einige Prozente des Normalwerts verbunden.

Wie wir vor kurzem mitgeteilt haben[1], entsteht bei der Zellkultur nach Dulbecco-Vogt schnell aus dem aeroben Stoffwechsel der normalen Nierenzellen ein Gärungsstoffwechsel von der Größe des Gärungsstoffwechsels der Krebszellen. In dieser Arbeit zeigen wir, daß diese schnelle und tiefgreifende Umwandlung des Energiestoffwechsels verbunden ist mit einer Abnahme der Katalase auf einige Prozente des Katalasegehaltes der normalen Nierenzellen. Der Katalasegehalt der in vitro gewachsenen Zellen ist dann zwar noch immer wesentlich höher als der Katalasegehalt der Krebszellen, aber die sehr starke und schnelle Abnahme der Katalase in den Dulbecco-Vogt-Kulturen stimmt zu dem Ergebnis, daß in diesen Kulturen die Umwandlung des normalen Stoffwechsels in den Krebsstoffwechsel vor sich geht.

Stoffwechsel

Wir haben die nach Dulbecco-Vogt trypsinisierten Nierenzellen in luftdicht verschließbaren Gefäßen (Abb. 1) gezüchtet, wobei die Gefäße mit 5 Vol.-% CO_2-Luft oder mit 5 Vol.-% CO_2-Argon gefüllt wurden, zur Prüfung, ob durch die

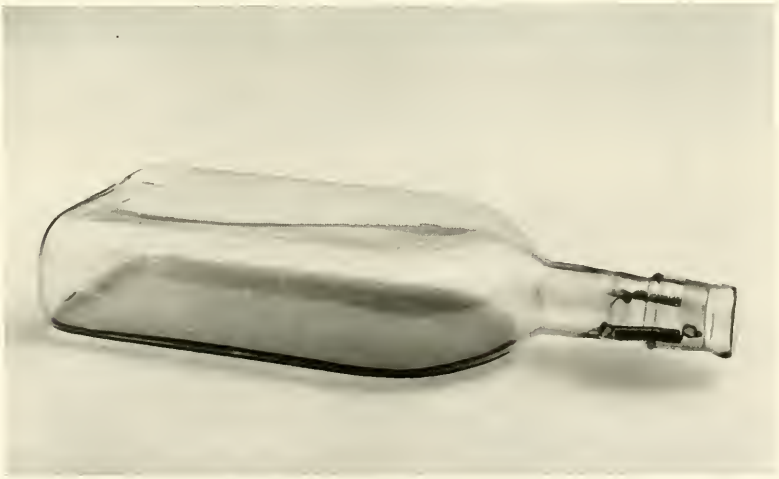


Abb. 1. Züchtungsgefäß, das durch Helmschliff luftdicht verschließbar ist. Volumen = 1200 cm³, eingefüllte Flüssigkeit = 70 cm³. Wesentlich ist wegen des Gasausgleichs die geringe Schichtdicke der Flüssigkeit, da das Gefäß während der Kultur nicht bewegt werden darf.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958) 586.

anaeroben Bedingungen die Entstehung des Krebsstoffwechsels beschleunigt wird.

Wir fanden z. B. die folgenden Q-Werte nach 8tägiger aerober oder anerober Kultur:

Impfzellen: $Q_{O_2} = -10{,}8$; $Q_M^{O_2} = 0$; $Q_M^{Argon} = +4{,}2$

8 Tage 5% CO_2-Luft	8 Tage 5% CO_2-Argon
$Q_{O_2} = -10{,}5$; $Q_M^{O_2} = +11{,}9$	$Q_{O_2} = -3{,}3$; $Q_M^{O_2} = +19{,}8$
$Q_M^{Argon} = +29$	$Q_M^{Argon} = +30$

Das Ergebnis war also, daß die große anaerobe Gärung immer beim Wachstum in vitro entsteht, gleichgültig, ob die Zellen aerob oder anaerob gezüchtet werden; daß aber das Absinken der Atmung — das außer dem Anstieg der anaeroben Gärung zum Krebsstoffwechsel gehört — mit dem Mangel an Sauerstoff während des Wachstums zusammenhängt.

Methoden

Das Versuchsmaterial waren Nieren etwa 3 Monate alter Kaninchen. Es wurde nur die Rinde der Nieren verwendet, die auf Rat von Herrn Dr. Klöne, Behringwerke Marburg, möglichst bindegewebefrei präpariert war. Die kleingeschnittene Rinde wurde einige Stunden bei 33° nach Dulbecco-Vogt mit einer 0,25proz. Lösung von Trypsin gerührt, alle 30 Min. wurden die freigesetzten Zellen abgegossen.

Trypsinlösung: 2,5 g Trypsin „Difco 1:250",
8,0 g NaCl,
0,2 g KCl,
1,15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$,
0,2 g KH_2PO_4,
0,1 g $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$,
mit bidest. Wasser auf 1 Liter.

Die zuerst abgegossenen Zellen wurden verworfen, alle weiteren Abgüsse wurden sofort auf 0° gekühlt, abzentrifugiert (10 Min. bei 100 *g*), mit Lactalbumin-Nährlösung aufgenommen und in die Zuchtkolben gebracht.

Lactalbumin-Nährlösung: 900 cm³ einer Lactalbumin-Hefeextrakt-Lösung,
5 g Lactalbuminhydrolysat „NBCo",
1 g Hefeextrakt „Difco",
1 g Glucose,
50 000 IE Penicillin (Penicillin G, Na-Salz „Hoechst"),
50 000 IE Streptomycin (Streptomycinsulfat „Hoechst"),
8,0 g NaCl,
0,4 g KCl
0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$,
0,14 g $CaCl_2$,
0,06 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$,
0,06 g KH_2PO_4,
10 mg Phenolrot,

mit bidest. Wasser auf 1 Liter
+ 50 cm³ inaktiviertes Kälberserum für Gewebekulturen „Behringwerke Marburg",
+ 50 cm³ 1,4proz. Na-bicarbonatlösung.

Die Begasung der liegenden Kolben mit 5 Vol.-% CO_2-Luft oder mit 5 Vol.-% CO_2-Argon wurde unter leichtem Bewegen der Kolben vorgenommen; dann wurden die Kolben durch Aufsetzen des Helmschliffes verschlossen und in den auf 35° eingestellten Brutschrank gebracht. Ein Bewegen der Zuchtkolben während des Anwachsens war zu vermeiden, da sich die Zellen ab-

setzen müssen, um Kontakt mit der Glaswand aufnehmen zu können. Wegen der Nicht-Bewegung der Zuchtkolben waren die Gasdrucke in den Zellen nicht so gut definiert wie bei der Manometrie.

Das beste Wachstum erhielten wir, wenn die Kolben in den ersten zwei Tagen mit 5% CO_2-Luft und dann mit 5% CO_2-Argon gefüllt waren. Das Nährmedium wurde gewechselt, wenn der Phenolrot-Indikator nach gelb umschlug.

Zur Bestimmung des Stoffwechsels und der Katalase wurden die Zellen mit Versen von der Glaswand in folgender Weise abgelöst. Das Nährmedium wurde abgegossen und die am Glas haftende Schicht von Zellen zweimal mit einer Salzlösung

(8,0 g NaCl,
0,2 g KCl,
1,15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$,
0,2 g KH_2PO_4,
mit bidest. Wasser auf 1 Liter)

gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einer Lösung von 0,02% Versen in obiger Salzlösung bei 35° abgelöst, aus dieser Zellsuspension abzentrifugiert (20 Min. bei 100 *g*) und für die Stoffwechselbestimmung mit inaktiviertem Mäuseascites-Serum und für die Katalasebestimmung mit Ringer-Bicarbonat aufgenommen.

Bestimmung der Katalase

Zur manometrischen Katalasebestimmung wurden in den Hauptraum eines Manometriegefäßes 3 cm³ Zellsuspension (in Ringer-Bicarbonat) und in die Birne 10 μMole H_2O_2 gegeben. Der Gasraum enthielt 5 Vol.-% CO_2-Luft, pH war 7,4, die Temperatur 38°. Durch Einkippen des H_2O_2 in den Hauptraum wurde der Sauerstoff aus dem H_2O_2 entwickelt. Aus dem linearen Teil der Kurve (Abb. 2) wurde dann die Anfangsgeschwindigkeit v_0 = mm³ O_2/Minuten berechnet und durch das Trockengewicht der Zellen in mg dividiert. Man erhält so den relativen Katalasegehalt der Zellen

$$Q_{\text{Katalase}} = \frac{v_0}{\text{mg Trockengewicht}}.$$

Die bei der Trypsinisierung zuerst abgegossenen frischen Nierenzellen enthalten noch rote Blutzellen, dagegen sind die später abgegossenen Zellen hinreichend frei von roten Blutzellen. Im übrigen fanden wir für die roten Blutzellen junger Ka-

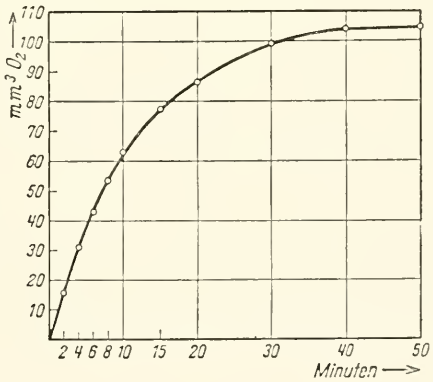


Abb. 2. Katalase in frisch trypsinisierten Nierenzellen. Bei t_0 10 μMole H_2O_2 in 3 cm³ Zellsuspension eingekippt. (Ringer-Bicarbonat, Gasraum: 5% CO_2-Luft, 38°). Trockengewicht der Zellen = 0,03 mg. v_0 = 7,7 mm³ O_2 pro Minute. Q_{Kat} = 257

ninchen einen Katalasewert Q_{kat} = 130, aber für die frischen Nierenzellen einen im Mittel 3mal höheren Katalasewert, so daß es ausgeschlossen ist, daß der hohe Katalasewert der frischen Nierenzellen von der Katalase beigemengter Blutzellen

herrührt. Optische Vergleichsmessungen zwischen roten Blutzellen und frisch trypsinisierten Nierenzellen zeigten, daß die Nierenzellen weniger als 2% rote Blutzellen enthielten.

Die Zellen der in vitro gewachsenen Kulturen waren frei von roten Blutzellen die überstehende Nährlösung wurde immer vor der Ablösung der Zellen abgegossen und verworfen. Im übrigen würde eine Beimengung von roten Blutzellen in diesem Fall bedeuten, daß der niedrige Katalasewert der gezüchteten Zellen tatsächlich noch niedriger ist als der gefundene.

Ergebnisse

Frische trypsinisierte Nierenzellen junger Kaninchen haben, wie die Zusammenstellung in Tab. 1 zeigt, eine relativ große Atmung, eine kleine anaerobe Gärung, gar keine aerobe Gärung und einen sehr hohen Katalasegehalt.

Versuch	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	Q_{Kat}
1	—11	0	+4,2	512
2	— 6,6	0	+3,7	444
3	—13,3	0	+4,3	257
4	— 9,5	0	+2,5	300

Tab. 1. Frische trypsinisierte Nierenzellen.

Die aus den Nierenzellen in vitro gezüchteten Zellen (Tab. 2) haben eine kleinere Atmung, eine beträchtliche anaerobe und aerobe Gärung und einen Katalasegehalt, der nur einige Prozente des Katalasewertes der frischen Nierenzellen beträgt.

Versuch	Alter der Kultur (Tage)	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	Q_{kat}
1	10	—3,5	+15	+29	5
2	14	—1,4	+8	+13	6
3	14	—3,6	+20,7	+33	8,5
4	16	—6,8	+21,7	+25	5,9
5	17	—2	+ 7,3	+15,8	7,6
6	20	—2,5	+11,2	+19,5	5,2

Tab. 2. In vitro aus Nierenzellen gezüchtete Zellen.

Für den Katalasegehalt der Asciteskrebs-Zellen der Maus fanden wir unter den gleichen Bedingungen $Q_{kat} = 0{,}6$ bis 1, also sehr wenig, in Übereinstimmung mit der Erfahrung, daß Krebszellen wenig Katalase enthalten.

Literatur

1 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A. W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 61.

64 Manometrisches Röntgenstrahlen-Aktinometer und über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Gärung von Krebszellen*

Von Otto Warburg, Walter Schröder, H. S. Gewitz
und Wolfgang Völker

Die anaerobe Gärung von Asciteskrebs-Zellen, suspendiert in Ringerlösung in geringer Zelldichte, wird durch Röntgenstrahlen-Dosen von einigen 1000 r um 50% gehemmt. Mit Hilfe dieses „Gärungstestes" haben wir gefunden, daß die Strahlenwirkung durch das Wasserstoffperoxyd ersetzt werden kann, das die Strahlen in der Zellsuspension erzeugt. — Ein manometrisches Röntgenstrahlen-Aktinometer wurde für diese Versuche entwickelt.

Da Röntgenstrahlen in Geweben H_2O_2 bilden; da H_2O_2 ein Zellgift ist; und da Krebszellen besonders wenig Katalase enthalten, so liegt die Vermutung nahe[1], daß die selektive Wirkung der Röntgenstrahlen auf Krebszellen mit ihrem niedrigen Katalasegehalt zusammenhängt. In dieser Arbeit zeigen wir, daß die Gärungshemmung, die in Krebszellen bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen auftritt, in der Tat durch nichts anderes erzeugt wird, als durch das von den Strahlen gebildete H_2O_2; daß man also die Wirkung der Strahlen ersetzen kann durch das von den Strahlen gebildete H_2O_2.

Man kann sich daraufhin fragen, ob die biologische Wirkung der Röntgenstrahlen allgemein über H_2O_2 geht, auch dann, wenn die wirksamen Strahlendosen kleiner sind als die gärungshemmenden Dosen. Es ist darauf zu antworten, daß überall, wo Sauerstoff zur Wirkung der Röntgenstrahlen notwendig ist, der Weg über das H_2O_2 wahrscheinlich ist, gleichgültig, ob die wirksamen Strahlendosen groß oder klein sind. Dagegen darf aus unsern Versuchen noch nicht geschlossen werden, daß die Strahlenwirkung im Fall der Krebszellen über die Gärungshemmung geht. Die Gärungshemmung ist hier lediglich ein Test, der es wegen seiner Schnelligkeit und Exaktheit ermöglicht hat, die Beziehung zwischen Strahlenwirkung und H_2O_2 zu finden.

Von früheren Arbeiten über die Wirkung der ionisierenden Strahlen auf Krebszellen erwähnen wir die Arbeiten von Crabtree[2], der in Dahlem die zellphysiologischen Methoden gelernt hat und nach Rückkehr in seine Heimat fand, daß bei O_2-Abschluß die Strahlenempfindlichkeit[2a] absinkt. Die Erklärung dieser wichtigen Beobachtung ist heute, daß bei Abwesenheit von O_2 die Strahlen kein H_2O_2 bilden können.

Crabtree arbeitete noch mit Gewebeschnitten; die Ära der Asciteskrebs-Zellen, die die biochemische Krebsforschung auf ein höheres Niveau gehoben hat, war noch nicht angebrochen. Wir haben im folgenden die neuen experimentellen Möglichkeiten auch für die Erforschung der Strahlenwirkung ausgenutzt und die Zellsuspensionen während der Bestrahlung schnell geschüttelt, wodurch die Konvektionsverhältnisse des Kreislaufes nachgeahmt, Verarmungserscheinungen vermieden und reproduzierbare Versuche erst ermöglicht wurden. Die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten der Messung der Absorption der Strahlen wurde da-

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 13b (1958), 591.

durch vermieden, daß wir, in Analogie zu unserm manometrischen Aktinometer[3] für das sichtbare Gebiet, ein manometrisches Aktionmeter für Röntgenstrahlen entwickelten (Abb. 1), in dem sowohl die Zellsuspension als auch unter sonst gleichen Bedingungen eine saure Ferrosulfatlösung bestrahlt wurde, deren Oxydation zu Ferrisulfat nach FRICKE[4] und nach neuen Versuchen von GLOCKER, MESSNER und ROESINGER[5] ein Maß der absorbierten chemisch wirksamen Strahlenenergie ist. So war bei jedem biologischen Bestrahlungsversuch, trotz komplizierter geometrischer Bedingungen, die absorbierte Strahlenenergie bekannt.

Abb. 1. Manometrisches Röntgenstrahlen-Aktinometer.

Bei dieser Versuchsanordnung erhält man direkt, ohne Umrechnung, die chemische Größe, auf die es bei der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen ankommt. Wird z. B. in der Bestrahlungszeit des biologischen Versuchs im Aktinometer 1 μMol Ferrosulfat zu Ferrisulfat oxydiert, so weiß man, daß beim biologischen Versuch von den Strahlen 1 μMol an Oxydations-Äquivalenten zur Verfügung stehen würde, falls von dem gespaltenen Wasser H + OH nichts zurückreagierte.

Will man die gefundenen Eisenwerte in Röntgeneinheiten r oder in absorbierte erg oder cal. umrechnen, so ist auf Grund der Arbeiten von FRICKE und GLOCKER zu setzen:

$$\frac{1\ \mu\text{Mol Eisen}}{\text{cm}^3} = 60\,000\ \text{r} = \frac{5{,}3 \cdot 10^6\ \text{erg}}{\text{cm}^3} = \frac{0{,}126\ \text{cal.}}{\text{cm}^3}.$$

In eigenen Versuchen fanden wir den r-Wert pro μMol Eisen etwas niedriger. Eine Plexiglas-Schale von 0,3 mm Bodenstärke enthielt 3 cm^3 der sauren Ferrosulfatlösung. Strahlung von 0,7 Å (Mikroapparat 91 von C. F. Müller, Hamburg, Molybdänanode, Zirkonblende, 40 KV, 28 mA) trat durch eine Lochblende (Durchmesser 1 cm) in die Lösung ein; die r-Werte am Anfang und Ende des Strahlungsweges (0,62 cm) wurden mit einer in der Bundesanstalt geprüften Weichstrahlkammer von Philips gemessen. Wir fanden 1 μMol oxydiertes Eisen pro cm^3 etwa gleich 56 000 r.

1. Manometrisches Röntgenaktionmeter

Bestrahlt man eine saure Lösung von Ferrosulfat bei Gegenwart von Sauerstoff mit Röntgenstrahlen, so wird Ferroeisen zu Ferrieisen oxydiert, nach JOSEPH WEISS[6] durch die folgenden Reaktionen:

$$\begin{aligned}
&2\,H_2O = 2\,H + 2\,OH\\
&2\,H + O_2 = H_2O_2\\
&2\,OH + 2\,Fe^{2\oplus} = 2\,OH^{\ominus} + 2\,Fe^{3\oplus}\\
&H_2O_2 + 2\,Fe^{2\oplus} = 2\,OH^{\ominus} + 2\,Fe^{3\oplus}\\
\hline
&2\,H_2O + O_2 + 4\,Fe^{2\oplus} = 4\,OH^{\ominus} + 4\,Fe^{3\oplus}. \qquad [1]
\end{aligned}$$

Ähnlich wie bei der Aktinometrie[3] des sichtbaren Lichts benutzen wir zur manometrischen Aktinometrie der Röntgenstrahlen ein mit Manometer verbundenes Glasgefäß (Abb. 1), in das die Strahlen von unten vertikal eindringen und das horizontal so geschüttelt wird, daß das Gefäß immer innerhalb des Strahlenkegels bleibt. Beim Arbeiten mit weichen Röntgenstrahlen benutzen wir ein Glasgefäß[7], dessen Boden nicht stärker als 0,2 mm ist, damit nicht zuviel Strahlenenergie durch Absorption in dem Glasboden verloren wird. Doch ist die Kenntnis der Absorption im Glasboden — die man leicht messen kann — im allgemeinen nicht erforderlich, da die Bestrahlung der Krebszellen in dem gleichen Gefäß und unter sonst gleichen Bedingungen vorgenommen wird wie die Bestrahlung der Eisenlösung.

Das Gefäß enthält 7 cm^3 10^{-3}-*n*. Ferroammoniumsulfat in 0,8-*n*. H_2SO_4, im Gasraum Luft. Beim Bestrahlen tritt ein negativer Druck h auf, aus dem sich der O_2-Verbrauch x_{O_2} durch die Gleichung $x_{O_2} = h \cdot k_{O_2}$ ergibt. $k_{O_2} = 1{,}645$ mm^2. Das oxydierte Eisen wurde optisch durch die Lichtschwächung i_0/i bei der Wellenlänge 300 mμ bestimmt.

$$c_{\text{Ferri}} = \frac{\ln (i_0/i)}{\beta \cdot d} \left[\frac{\mu\text{Mole Fe}}{\text{cm}^3}\right]$$

wenn d in cm und β in cm^2/μMole Fe ausgedrückt wird. Für die Absorptionskonstante fanden wir $\beta = 5{,}05 \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mole Fe}}$. Die Temperatur bei der Bestrahlung war 20^0. Röntgenröhre RT 100 von C. H. F. Müller, Hamburg.

Zum Beispiel wurden 7 cm^3 der Eisenlösung in 5 cm Abstand von der Wolframanode (100 kV, 8 mA, 1,8 mm Aluminiumfilter) 15 Minuten bei 20^0 geschüttelt. Die Druckänderung im Gefäß betrug dann $h = -14{,}5$ mm, also $x_{O_2} = h \cdot k_{O_2} = -23{,}9$ $mm^3 = 1{,}07$ μMole, also O_2-Verbrauch pro $cm^3 = 1{,}07/7 = 0{,}153$ Mikromole.

Die optische Eisenbestimmung wurde 30 Minuten nach der Bestrahlung vorgenommen, um sicher zu sein, daß alles H_2O_2 mit dem Eisen reagiert hatte. Dann wurde auf das 5fache mit 0,8-*n*. H_2SO_4 verdünnt und bei 1 cm Schichtdicke i_0/i bestimmt, wobei $\ln(i_0/i) = 0{,}613$ gefunden wurde, also für die unverdünnte Lösung $c_{\text{Ferri}} = 0{,}608$ μMole Fe/cm^3 und das Verhältnis Eisen zu Sauerstoff

$$\frac{\text{Fe}}{\text{O}_2} = \frac{0{,}608}{0{,}153} = 4{,}0.$$

Da 1 Molekül O_2 verbraucht wird, wenn 4 Eisenatome oxydiert werden und da außerdem die optische Bestimmung des Eisens empfindlicher ist als die manometrische Bestimmung des O_2, so muß man sich bei der Bestimmung kleiner Strahlendosen mit der Bestimmung des Eisens begnügen. Doch überzeuge man sich durch Anwendung höherer Strahlendosen, daß das Verhältnis Eisen : Sauerstoff im Aktinometer 4 ist, wie es die Gl. [1] verlangt.

Natürlich ist es Bedingung der Eisendosimetrie, daß weder der O_2 noch das Ferroeisen im Lauf der Bestrahlung vollständig verbraucht werden. In dem mit Luft geschüttelten Gefäß nahm der O_2-Druck in der Lösung während der Bestrahlung fast nicht ab. Die in das Gefäß eingefüllte Menge an Ferroeisen — 7 μMole — war so groß, daß sie bei keiner Bestrahlung verbraucht wurde.

Die Strahlenquelle bei allen biologischen Versuchen war das Röntgengerät RT 100 von C. H. F. Müller, Hamburg, das mit 100 kV und 8 mA betrieben wurde.

Die Entfernung des Aktinometerbodens von der Wolframelektrode betrug im allgemeinen 9,5 cm, bei Filterung der Strahlung durch 1,8 mm Aluminium.

2. Versuchsanordnung

Unser Versuchsmaterial war Ehrlichs Mäuseascites-Krebs, dem bei der Entnahme 0,2 mg Heparin (Hoffmann-Laroche) pro cm^3 zugesetzt wurde. Dann wurde zweimal mit einer „Salzlösung" gewaschen, die, um Nachgerinnung zu vermeiden, kein Calcium enthielt und die folgende Zusammensetzung hatte: 98 cm^3 0,9% NaCl, 2 cm^3 1,15% KCl und 20 cm^3 1,4% $NaHCO_3$. Ein Zusammenkleben der Zellen trat dann beim Zentrifugieren nicht ein. Wurde nicht gewaschen, sondern nach dem Zentrifugieren direkt auf Ascites-Volumen aufgefüllt, so brauchte das Ca aus der Ringerlösung nicht fortgelassen zu werden. Die Suspensionen wurden auf Ascitesvolumen aufgefüllt und konnten während eines Tages ohne erhebliche Schädigung im Eisschrank aufbewahrt werden.

Zum Versuch wurde die Krebszellen-Suspension, die pro cm^3 40 bis 60 mg Zelltrockensubstanz enthielt, mit der „Salzlösung" oder Ringerlösung sehr stark verdünnt, weil sich zeigte, daß die Strahlenempfindlichkeit um so größer war, je niedriger die Zellkonzentration war. 7 cm^3 der verdünnten Krebszellen-Suspension wurden in das Aktinometergefäß (Abb. 1) eingefüllt und hier bei 20^0 mit 5 Vol.-% CO_2 — O_2 gesättigt, so daß pH etwa 7,4 war. Die Temperatur bei der Bestrahlung war 20^0. War vorher in dem gleichen Gefäß, unter den gleichen Volum- und Schüttelbedingungen an der gleichen Stelle des Röntgenstrahls der Eisenwert bestimmt worden, so war die chemisch wirksame, absorbierte Energie der Röntgenstrahlen bei jedem biologischen Versuch bekannt.

War die Bestrahlung beendet, so wurden je 3 cm^3 der bestrahlten Zellsuspension in ein anderes Manometriegefäß pipettiert. Nach Zugabe von 0,06 cm^3 10proz. Glucoselösung wurde mit 5 Vol.-% CO_2-Argon gesättigt, bei 38^0 in der üblichen Weise die anaerobe Gärung durch Ablesung in 3mal 20 Minuten gemessen, und mit der Gärung einer nicht bestrahlten Kontrolle verglichen. Die prozentische Gärungshemmung war unser Maß der Strahlenwirkung.

3. Gärungshemmung

Enthielt eine Suspension von Krebszellen in „Salzlösung" 0,179 mg Zelltrockensubstanz pro cm^3 und wurde in 9,5 cm Focusabstand 0 oder 2,5 oder 5 oder 7,5 Minuten bei 20^0 und bei Sättigung mit 5 Vol.-% CO_2 — O_2 bestrahlt, so wurden nach der Bestrahlung in 3 cm^3 der Suspension die folgenden Gärungen erhalten:

Bestrahlt	0′	2,5′	5,0′	7,5′
mm^3 CO_2 aus Milchsäure	19,7	16,9	6,2	3,1
Gärungshemmung in 60′	bei $38,5^0$	13%	69%	84%

In Abb. 2 sind die Gärungshemmungen gegen die Eisenwerte aufgetragen. Ist der Eisenwert 0,054 μMole/cm^3, d. h. der r-Wert 3300, so beträgt die Gärungshemmung 50 Prozent.

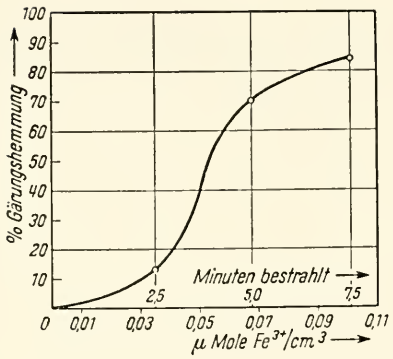


Abb. 2. Gärungshemmung nach Bestrahlung in Salzlösung. Zelldichten konstant, Bestrahlungszeiten variiert.

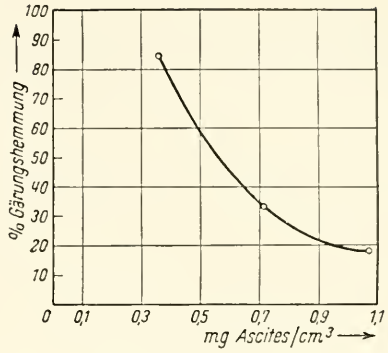


Abb. 3. Gärungshemmung bei variierten Zelldichten. Strahlungsdosis konstant.

4. Zelldichte variiert

Wurde bei Suspension der Zellen in Salzlösung die Zelldichte variiert, während die Strahlungsdosen konstant gehalten wurden, so wurden die Gärungshemmungen um so größer gefunden, je niedriger die Zelldichten waren. Wurde z. B. bei einem Focusabstand von 9,5 cm immer 8 Minuten bestrahlt, wobei der Eisenwert 0,168 μMole Fe/cm^3 war, und wurden die Zelldichten um das 3fache variiert, so wurden die folgenden Gärungshemmungen erhalten:

Zelldichte Trockensubstanz/cm^3 [mg]	Gärungs-hemmung [%]	Zellsubstanz zerstört [mg]
0,357	82,4	0,29
0,715	33	0,24
1,07	18	0,19

wobei in der letzten Spalte die aus der Gärungshemmung berechnete Menge an zerstörter Zellsubstanz angegeben ist. Wie man sieht, zerstört die gleiche Strahlendosis, unabhängig von der Zelldichte, die gleiche Größenordnung an Zellen, also prozentisch um so weniger, je größer die Zellmenge ist.

Eine derartige Beziehung findet man immer dann, wenn maßgebend für die Strahlenwirkung die Strahlenabsorption in der Suspensionsflüssigkeit ist, nicht die Strahlenabsorption in den Zellen. Wäre die Absorption in den Zellen maßgebend, so müßte bei 3facher Zelldichte und geringer Gesamtabsorption die 3fache Zellmenge zerstört werden, also die *prozentische* Gärungshemmung unabhängig von der Zelldichte sein. Die gefundene Beziehung zwischen Zelldichte und Gärungshemmung, die in der Kurve der Abb. 3 zum Ausdruck kommt, stimmt gut zu dem folgenden Ergebnis, daß die Strahlenwirkung über das H_2O_2 erfolgt.

5. Sauerstoffdruck variiert

Wurde bei der Bestrahlung O_2 ausgeschlossen, so wurde bei sonst wirksamen Strahlendosen keine Gärungshemmung gefunden. Wurden z. B. Zellen in Salzlösung suspendiert und betrug die Zelldichte 0,358 mg Trockensubstanz/cm^3, und

wurde bei 9,5 cm Focusabstand 10 Minuten bestrahlt (Eisenwert 0,129 Mole/cm³), so wurde aerob, in 5 Vol.-% CO_2 —O_2, 75% Gärungshemmung, aber anaerob, in 5 Vol.-% CO_2 — Argon, *keine* Gärungshemmung gefunden.

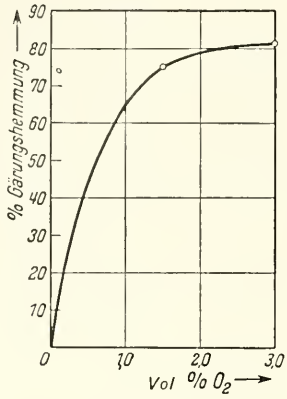


Abb. 4. Gärungshemmung bei variierten Sauerstoffdrucken. 0,36 mg Zelltrockensubstanz pro cm³ Salzlösung. Strahlendosis 0,129 μMole Eisen pro cm³. Die O_2-Drucke wurden manometrisch mit Ferropyrophosphat bestimmt.

Wurde der O_2-Druck von 0,5% einer Atmosphäre bis zu höheren Drucken variiert, so stieg die Gärungshemmung mit steigendem O_2-Druck bis bei etwa 3% einer Atmosphäre der Endwert der Gärungshemmung erreicht war (Abb. 4). Für derartige Versuche ist das manometrische Aktinometer besonders geeignet, da es leicht ist, trotz des O_2-Verbrauchs in den Zellsuspensionen durch schnelles Schütteln den O_2-Druck in den bestrahlten Lösungen konstant zu halten.

6. Serum

Mißt man die anaerobe Gärung von Asciteskrebszellen in Salzlösungen oder Ascitesserum (das verhältnismäßig eiweißarm ist) oder in inaktiviertem Normalserum, so findet man in Serum höhere Gärungswerte

	in Salzlösung	in Ascitesserum	in Normalserum
Q_M^{Argon}	48	72	97

In Normalserum ist also die Gärung etwa doppelt so groß wie in Salzlösung, was hier der Vollständigkeit wegen angeführt sei, obwohl die absoluten Größen der Gärung für das folgende, wo es nur auf die *Hemmungen* der Gärung ankommt, wahrscheinlich bedeutungslos sind.

Nicht weil in Serum die Gärung größer ist, sondern aus anderen Gründen ist der Eiweißgehalt der Suspensionsflüssigkeit für die Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung. Betrug z. B. die Zelldichte 0,179 mg Zelltrockensubstanz pro cm³ und waren die Zellen mit 5 Vol.-% CO_2 — O_2 gesättigt, so betrug die Strahlendosis, die die Gärung um 50% hemmte:

	Strahlendosis Eisenwert	r-Wert
In Salzlösung	0,054 μMole Fe/cm³	3 250
In Ascitesserum	0,260 μMole Fe/cm³	15 600
In Normalserum	1,060 μMole Fe/cm³	64 000

Die Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen hängt also in einem ganz unerwarteten Maße von dem Eiweißgehalt der Suspensionsflüssigkeit ab, sie ist in Normalserum *20mal* kleiner als in Salzlösung. Die Ursache ist, wie sich später zeigte, der Verbrauch von H_2O_2 durch das Serum.

Die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Eiweißgehalt der Umgebung ist auch für die Therapie wichtig. Bekanntlich variiert der Eiweißgehalt der Gewebslymphe erheblich, womit nach dem vorhergehenden auch die Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen erheblich variieren muß. Wurde inaktiviertes Normalserum mit Salzlösung auf das 4fache verdünnt und so eine „Lymphe" von etwa 2,5% Eiweißgehalt hergestellt, so fanden wir die Strahlendosis, die die Gärung um 50% hemmte:

	Strahlendosis Eisenwert	r-Wert
In der Salzlösung	0,054 μMole Fe/cm^3	3250
In der „Lymphe"	0,13 μMole Fe/cm^3	7800

7. Katalase

Waren die Zellen in Salzlösung suspendiert und wurde bei der Bestrahlung chemische reine Katalase von Boehringer in Mengen von 1 bis 10 γ pro cm^3 zugesetzt, so sank die Strahlenempfindlichkeit sehr erheblich. Die zugesetzte Katalase war dabei in *m*/20-Phosphat pH 7,4 gelöst.

Zum Beispiel fanden wir für Zellen, die in Salzlösung suspendiert und in 9,5 cm Focusabstand 8 Minuten bestrahlt waren:

Zelldichte mg trocken/cm^3	Eisenwert μMole Fe/cm^3
0,36	0,1
0,36	0,1

Gärungshemmungen ohne Katalase [%]	+ 1,4 γ/cm^3 Katalase [%]	+ 7,0 γ/cm^3 Katalase [%]
88	27	16,5
88	29	17

Die Gärungshemmung sank also durch Zusatz von 7 γ Katalase pro cm^3 auf den fünften Teil, womit fast bewiesen war, daß es das von den Strahlen erzeugte H_2O_2 ist, das die Gärung hemmt. Daß die Katalase die Strahlenwirkung nicht vollständig verhindert, ist verständlich, da die Katalase nicht in die Zellen eindringt, so daß in die Zellen eindringendes H_2O_2 der Zersetzung durch die zugesetzte Katalase entgeht.

8. Gärungshemmung durch Wasserstoffsuperoxyd

Bei Versuchen über die Hemmung der Gärung durch Wasserstoffperoxyd zeigte es sich, daß es nicht gleichgültig war, innerhalb welcher Zeit eine gegebene Menge H_2O_2 zu den Krebszellen zugegeben wurde. Wurden z. B. zu einer Krebszellen-Suspension, die 5,87 mg Trockensubstanz in 7 cm^3 Salzlösung enthielt, 0,15 μMole

H_2O_2 entweder in 1 Sekunde, oder allmählich im Lauf von 4 Minuten zugesetzt, so betrug die Gärungshemmung im ersten Fall 9,5%, im zweiten Fall aber 60 Prozent. Bei Versuchen über den Ersatz der Bestrahlung durch die strahlenäquivalente Menge an H_2O_2 mußte deshalb der H_2O_2-Zusatz auf die Bestrahlungszeiten des parallelen Bestrahlungsversuches verteilt werden. Waren die Bestrahlungszeiten 4, 6 und 8 Minuten, so mußten auch die Zusatzzeiten für das H_2O_2 4, 6 oder 8 Minuten betragen.

9. Ersatz der Bestrahlung durch Wasserstoffsuperoxyd

Um das bei der Bestrahlung von Krebszellen-Suspensionen gebildete H_2O_2 zu bestimmen, inaktivierten wir vor der Bestrahlung die Katalase der Krebszellen, wozu 10 Minuten Erhitzen auf 57° genügte. Nach der Bestrahlung wurde die Zellsuspension mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 5%) enteiweißt. Dann wurde 1/3 des Volumens Titanreagens (nach TREADWELL) zugegeben, die entstehende Gelbfärbung wurde mit dem Spektralphotometer bei 436 mμ für eine Schichtdicke von 3 cm gemessen:

$$\beta = \frac{\ln (i_0/i)}{c \cdot d} = 1{,}38 \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mole } H_2O_2}\right]$$

$$C_{H_2O_2} = \frac{\ln (i_0/i)}{1{,}38 \cdot d} \left[\frac{\mu\text{Mole } H_2O_2}{\text{cm}^3}\right]$$

wo d in cm und c in μMolen pro cm³ auszudrücken ist.

Wurden z. B. inaktivierte Krebszellen, deren Trockensubstanz 5,8 mg betrug, in 7 cm³ Salzlösung suspendiert, mit 5 Vol.-% CO_2 — O_2 gesättigt und bei 20° im manometrischen Aktinometer bestrahlt, so wurden nach Bestrahlung bei einem Focusabstand von 6,5 cm die folgenden Mengen H_2O_2 in den 7 cm³ gefunden*:

Bestrahlungsdauer	4	6	8	Minuten
Eisenwert in 7 cm³	1,40	2,10	2,80	μMole Fe
H_2O_2 in 7 cm³	0,10	0,15	0,21	μMole H_2O_2

Wurden statt der inaktivierten Krebszellen lebende Krebszellen in sonst gleicher Weise bestrahlt, so wurden nach der Bestrahlung die folgenden Gärungshemmungen gefunden:

Bestrahlungsdauer	4	6	8	Minuten
Gärungshemmung	62	81	95	Prozent

Bei Einhaltung dieser Bedingung wurden die folgenden Gärungshemmungen gefunden, wenn zu 7 cm³ Salzlösung, die 5,8 mg Zellen (Trockensubstanz) enthielten, steigende Mengen an H_2O_2 — ohne Bestrahlung — zugesetzt wurden:

μMole H_2O_2, zugesetzt	0,15	0,20	0,25
Gärungshemmung [%]	60	83	91

* Vergleicht man den Eisenwert mit dem in der Zellsuspension gebildeten H_2O_2, so sieht man, daß die Ausbeute an H_2O_2 nur 14% der Theorie beträgt; daß also der größere Teil der Spaltprodukte des Wassers in der Zellsuspension zu Wasser zurückreagiert ($H + OH = H_2O$. Siehe die Gleichungen in Abschnitt 1).

Vergleichen wir diese Gärungshemmungen mit den Gärungshemmungen durch Bestrahlung, für Aliquote der gleichen Zellsuspension (nach Abschnitt 8), so erhalten wir:

Bestrahlungszeiten [Min.]	4	6	8
Gärungshemmung durch Bestrahlung [%]	*62*	*81*	*94*
H_2O_2 durch die Bestrahlung erzeugt [μMole]	0,105	0,15	0,21
H_2O_2 ohne Bestrahlung zugesetzt [μMole]	0,15	0,20	0,25
Gärungshemmung durch Zusatz von H_2O_2 (ohne Bestrahlung) [%]	*60*	*83*	*91*

womit der Beweis erbracht ist, daß man die Strahlenwirkung nahezu ersetzen kann durch das H_2O_2, das die Strahlen erzeugen, ein Ergebnis, zu dem alles übrige, was in dieser Arbeit mitgeteilt ist, stimmt: daß die Gärungshemmung mit der Zelldichte abnimmt; daß bei anaerober Bestrahlung keine Gärungshemmung gefunden wird; daß Serum die Strahlenempfindlichkeit herabsetzt.

Literatur

1 Warburg, O., Gawehn, Karlfried, und Geissler, A.W., Z. Naturforschg. 12b (1957), 393. Warburg, O., Schröder, W., Gewitz H. S., und Völker, W.. Naturwissenschaften 45 (1958), 192.

2 Crabtree, H. G., und Cramer, W., Imp. Cancer Res. Fund 11 (1934), 103.

2a Gemessen durch das Wachstum der bestrahlten Tumoren im Körper.

3 Warburg, O., Schwermetalle, Berlin 1946, letzte Seite (Übersetzung Heavy Metals, Clarendon Press, Oxford 1949) sowie O. Warburg und V. Schocken, Arch. Biochemistry 21 (1948), 363.

4 Fricke, H., Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy 18 (1927), 426.

5 Glocker, R., Messner, D., und Roesinger, R., Z. physik. Chem., Neue Folge 13 (1957), 129.

6 Weiss, J., Nature (London) 153 (1944), 748.

7 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 434.

65 Partielle Anaerobiose und Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen*

Otto Warburg, Karlfried Gawehn, August-Wilhelm Geissler, Walter Schröder, Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

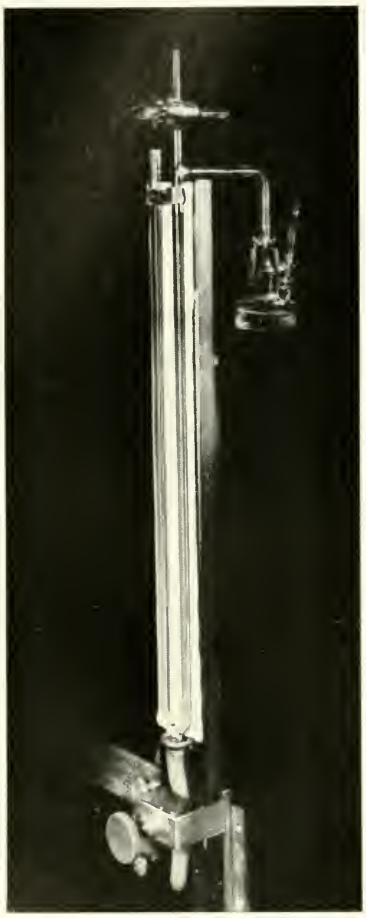


Abb. 1. Manometer zur Messung des Stoffwechsels der normalen Zellen und der Krebszellen.

Zunächst soll gezeigt werden, wie groß die Unterschiede zwischen dem normalen Stoffwechsel und dem Krebstoffwechsel sind. Ein Manometriegefäß enthält die Zellen. Sie sind in Serum suspendiert und werden bei 38°, gesättigt mit 5 Vol.-% Kohlensäure—Sauerstoff, schnell geschüttelt (Abb. 1).

Atmen die Zellen, so entstehen negative Drucke. Gären die Zellen, so treibt die entstehende Milchsäure Kohlensäure aus dem Bicarbonat des Serums aus und es entstehen positive Drucke. In Abb. 2 sind die hierbei beobachteten Druckänderungen[1], die je 10 mg Zellen erzeugen, als Funktion der Zeit eingetragen. Alle normalen Zellen erzeugen in unserm Versuchsgefäß negative Drucke, zum Beispiel Gehirn, Uterus, Niere, Leber, Milz und Chorion. Die Krebszellen und nur sie alleine erzeugen in dem gleichen Gefäß positive Drucke. Wir machen besonders auf die Kurve VII aufmerksam, die von normalen embryonalen Zellen herrührt und die zeigt, daß normale Zellen, auch wenn sie schnell wachsen, negative Drucke geben.

In der Literatur wird noch heute öfters behauptet, daß die weißen Blutzellen Krebstoffwechsel haben. Das stimmt nicht**. Weiße Blutzellen haben lediglich die Besonderheit, daß sie bereits durch Abkühlung, durch Zentrifugieren, vor allem aber durch Übertragung in Salzlösungen geschädigt werden und dann, durch Entkoppelung der Atmung, aerob gären. Abb. 3 zeigt einen Versuch, bei dem der Stoffwechsel der weißen Blutzellen unter streng physiologischen Bedingungen mit der 2-Gefäß-Methode gemessen wurde[2]. Die ausgezogenen Linien rühren

---

* Aus Archives of biochemistry and biophysics, Volume 78 (1958): 573—586. Academic Press. Inc

** *Zusatz 1961.* Vergl. Beitrag Nr. 74 dieses Buches.

Zusatz 1961. Auf Grund dieser Arbeit ist bereits von verschiedenen Seiten die Therapie des Krebses mit H_2O_2 in Angriff genommen worden. Ich möchte beson-

von den weißen Blutzellen her, die also in beiden Gefäßen negative Drucke geben. Die gestrichelten, im positiven Druckgebiet liegenden Linien sollen zeigen, was man finden würde, wenn es wahr wäre, daß die weißen Blutzellen Krebsstoffwechsel haben.

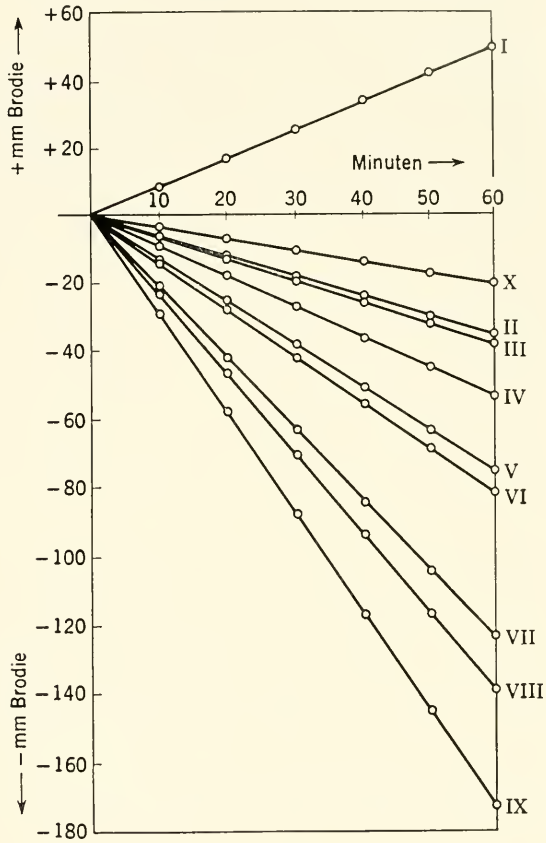


Abb. 2. Stoffwechsel von normalen Zellen und von Krebszellen.

Kleines Gefäß $v = 16{,}1$ cm³; $vF \sim 7$ cm³. Krebszellen und normale Körperzellen in homologem, mit Milchsäure angereichertem Serum. Je 10 mg Zellen (Trockengewicht). 38°. 5 Vol.-Prozent $CO_2 - O_2$

I Mäuseascites-Krebszellen.
II Rattengehirn (Mark).
III Mäuse-Uterus (nicht geschnitt.).
IV Ratten-Niere (Mark)
V Ratten-Milz
VI Ratten-Gehirn (Rinde).
VII Mäuse-Chorion.
VIII Ratten-Leber.
IX Ratten-Niere (Rinde + Mark).
X Ratten-Netzhaut.

Wahrscheinlich gibt es keine Ausnahme von der Regel, daß alle normalen Körperzellen im Körper nur atmen und nicht gären. Sicher gibt es nichts, was obligater

---

ders Manfred v. Ardenne und Prof. Sprung nennen, die zur Zeit versuchen, bei der Krebstherapie zuerst die roten Blutzellen zu entfernen und dann mit Wasserstoffperoxyd zu behandeln. Ich erwähne ferner die Behandlung von Krebs mit solchen Peroxyden, die leicht Wasserstoffperoxyd abspalten; oder die Behandlung von Krebs mit autoxydabeln Substanzen, bei deren Autoxydation Wasserstoffperoxyd entsteht. Wahrscheinlich beruht die therapeutische Wirkung von Bayer E 39, das ein Chinon ist, auf der Bildung von Hydrochinon mit folgender Wasserstoffperoxydbildung bei der Reoxydation. Vergl. H. Holzer, Bioch. Z. 330 (1958), 59; J. Pütter, Verh. D. Ges. Pathol. 41 (1957), 374 sowie Z. f. Krebsforschung 64, 101, 1961; M. Frimmer, Med. exp. 3 (1960), 135. Auch die Versuche, durch Impfung mit Anaerobiern Krebs zu heilen, sind eine direkte Anwendung der von uns entdeckten Anaerobiose der Krebszellen. Vergl. dazu O. Warburg, Metabolism of Tumors, Constable (London) 1930.

aerob ist als die normale embryonale Entwicklung, was die Embryologen seit 100 Jahren gewußt haben. Die Gärung der normalen embryonalen Zellen war im wesentlichen eine Polemik gegen die Gärung der Krebszellen.

Entdifferenzierung durch Gärung

Gärung ist die energieliefernde Reaktion des Lebens gewesen zu einer Zeit, als die Erdatmosphäre noch keinen Sauerstoff enthielt. Gärung ist eine gröbere Art der biologischen Energieproduktion als Atmung, da die Gärung zur Produktion der gleichen Energiemenge rund 10mal soviel Substanz braucht wie die Atmung. Wahrscheinlich deshalb ist die Natur im Lauf der Phylogenese von der Gärung zur Atmung übergegangen und nur die niedersten Lebewesen sind bei der Gärung geblieben. Aber noch immer enthalten alle Lebewesen latent die Fähigkeit zur Gärung, die sofort manifest wird, wenn man den Zellen den Sauerstoff entzieht.

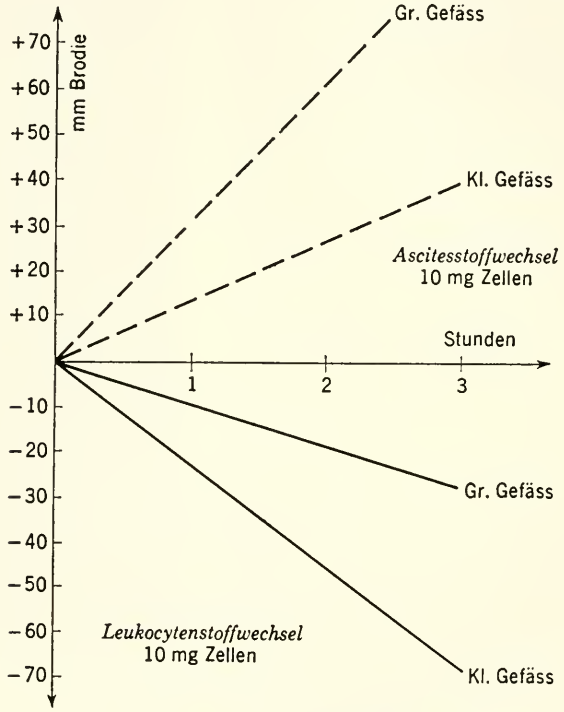


Abb. 3. Stoffwechsel der weißen Blutzellen.

So kann man alle atmenden Zellen durch Entziehung von Sauerstoff wieder zur Gärung zwingen. Tut man das, zum Beispiel indem man atmenden Hefezellen den Sauerstoff entzieht, so büßen diese Zellen ihre bereits höher entwickelte Struktur ein. Um so mehr werden die hochdifferenzierten Körperzellen, wenn sie aus irgendeinem Grund zur Gärung gezwungen werden, ihre hohe Differenzierung einbüßen und zu den niederen Formen des Lebens zurückkehren. So erklärt die Energetik, warum die gärenden Krebszellen ungeordnet und unbeschränkt wachsen wie die niedersten Lebewesen.

Carcinogenese in Vitro

Wenn wir sagen, daß die normalen Körperzellen im Körper nur atmen und nicht gären, so müssen wir die Einschränkung machen, daß die normalen Körper-Zellen im Körper gewachsen sein müssen. Wurden nämlich normale Herzfibroblasten nach CARREL außerhalb des Körpers gezüchtet und wurde nach längerer Züchtung der Stoffwechsel gemessen, so fanden wir keinen normalen Stoffwechsel, sondern den Gärungsstoffwechsel der Krebszellen[3]. Der Stoffwechsel der normalen Körperzellen schien also verschieden zu sein, je nachdem sie im Körper oder außerhalb des Körpers gewachsen waren, ein unverständliches Ergebnis zu einer Zeit, als noch niemand zu vermuten wagte, daß man normale Körperzellen in Krebszellen umwandeln kann einfach dadurch, daß man die normalen Zellen einige Zeit außerhalb des Körpers züchtet.

Heute ist die Carcinogenese bei der *in vitro*-Kultur normaler Zellen allbekannt. Die Pionierarbeit ist von GOLDBLATT und CAMERON[4], die vor 5 Jahren fanden, daß normale Herzfibroblasten, wenn sie nach jahrelanger *in vitro*-Kultur in den Körper zurückgepflanzt werden, nicht als Herzfibroblasten weiterwachsen, sondern als Krebszellen. EARLE, LIKELY und SANFORD[5] haben dieses Ergebnis in großen Versuchsreihen und für andere Zellarten in einem solchen Umfang bestätigt, daß man heute Krebszellen aus normalen Zellen durch *in vitro*-Kultur in industriellem Maßstab gewinnen kann.

Die Gärung der *in vitro* wachsenden normalen Zellen ist also heute kein Widerspruch mehr gegen den Zusammenhang zwischen Gärung und Krebs; im Gegenteil, sie ist ein neuer und unabhängiger Beweis dafür geworden. Denn die *in vitro* wachsenden normalen Zellen sind in Wirklichkeit keine normalen Zellen, sondern Zellen, die in Umwandlung zu Krebszellen begriffen sind.

Anstieg der Gärung

Wenn es nunmehr feststeht, daß bei der *in vitro*-Kultur normale Zellen in Krebszellen umgewandelt werden, so ist offenbar hier eine Methode gegeben, um die

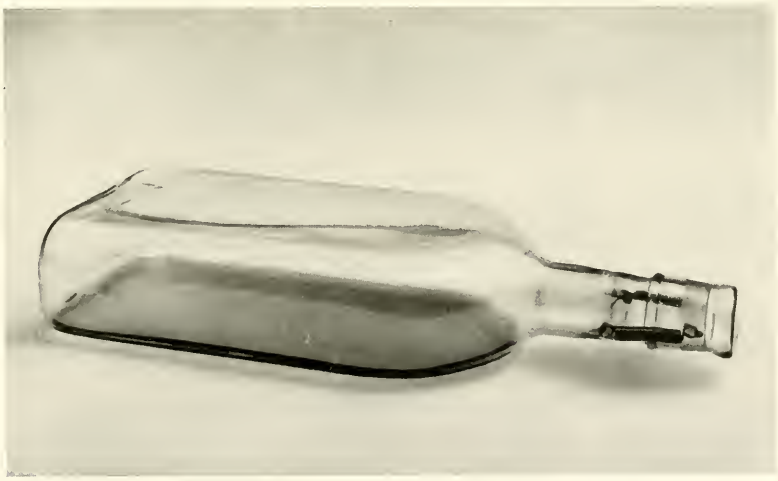


Abb. 4. Gasdicht verschließbares Züchtungsgefäß für Zellkulturen nach Dulbecco-Vogt.

Krebsentstehung unter sehr einfachen experimentellen Bedingungen zu untersuchen. In der Tat ist die *in vitro*-Kultur normaler Zellen heute die wichtigste Methode der Krebsforschung, und es gibt meines Erachtens kein Problem der Krebsentstehung, das mit dieser Methode nicht gelöst werden könnte.

Wir haben in der letzten Zeit die Methode benutzt, um zu untersuchen, wann bei der Krebsentstehung der normale Stoffwechsel in den Krebsstoffwechsel umschlägt. Als Züchtungsmethode haben wir dabei anstelle der alten Carrel-Methode die neue Methode von DULBECCO-VOGT[6] gewählt, weil sie schneller die für Stoffwechselmessungen notwendigen Zellmengen liefert. Bei dieser Methode wird normales Körpergewebe, z. B. Nierengewebe, mit Trypsin in Einzelzellen aufgeteilt. Die erhaltenen Zellsuspensionen werden in verschließbaren Kulturkolben

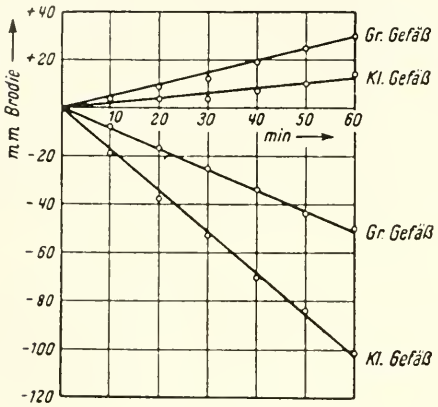


Abb. 5. Umschlag des Stoffwechsels bei der *in vitro*-Kultur von Nierenzellen.

Aerobe Bedingungen. Je 10 mg Zellen (trocken) pro Gefäß. Negative Drucke: Nierenzellen nach 0 Tagen Kultur. $Q_{O_2} = -12$, $Q_M^{O_2} = 0$, Positive Drucke: Nierenzellen nach 16 Tagen Kultur. $Q_{O_2} = -7$, $Q_M^{O_2} = +15$.

(Abb. 4) in den Brutschrank gestellt, wo ein Teil der Zellen freischwebend in der Flüssigkeit bleibt und nicht wächst, während ein anderer Teil am Glasboden anwächst und bald den ganzen Boden mit einer dünnen Schicht neugewachsener Zellen bedeckt.

Mißt man nach 1 bis 2 Wochen den Stoffwechsel derartiger Kulturen, so findet man[7], daß die nicht angewachsenen Nierenzellen den normalen Nierenstoffwechsel haben, den sie bei der Einsaat hatten, und den sie beibehalten, bis sie absterben. Niemals haben wir in diesen Zellen den geringsten Anstieg einer Gärung gefunden. Mißt man aber den Stoffwechsel der am Glasboden angewachsenen Zellen, so findet man immer eine große Gärung.

Wie sich dieser Umschlag des Stoffwechsels von Atmung zu Gärung bei der Manometrie auswirkt, zeigt Abb. 5, in der die beobachteten Druckänderungen als Funktion der Zeit eingetragen sind, negative Drucke nach unten und positive Drucke nach oben. Die unteren Kurven, also die negativen Drucke, rühren von den eingesäten Nierenzellen her, ihr Stoffwechsel ist ein reiner Oxydationsstoffwechsel. Die oberen Kurven, also die positiven Drucke, rühren von den angewachsenen Zellen her, ihr Stoffwechsel ist nahezu der Stoffwechsel von Krebszellen.

Trotz vieler Versuche haben wir bisher keine *in vitro* gewachsenen Zellen gefunden, die nicht gären, so daß wir annehmen müssen, daß die Gärung sofort erscheint, wenn die Zellen *in vitro* wachsen. Offenbar gehört die Gärung untrenn-

bar zu dem Wachstum *in vitro*, ebenso wie die reine Atmung, ohne Gärung, untrennbar zu dem normalen Wachstum im Körper gehört. Bedenkt man, daß das Wachstum *in vitro* kein geordnetes Wachstum ist — Nierenzellen wachsen ja nicht zu Nierengewebe heran, sondern zu einer formlosen Masse von Zellen — so können wir unser Ergebnis allgemein folgendermaßen ausdrücken: Reine Atmung, ohne Gärung, ist das Attribut des geordneten Wachstums, Gärung ist das Attribut des ungeordneten Wachstums, sei es *in vitro*, sei es im Körper.

Ungeordnetes Wachstum im Körper ist Krebs. Ungeordnetes Wachstum *in vitro kann*, aber muß noch nicht Krebs sein. Es ist Krebs, wenn die *in vitro*-Kultur beim Überimpfen auf Tiere so weiter wächst, wie sie *in vitro* gewachsen ist.

Abfall der Atmung

Zum Krebsstoffwechsel gehört nicht nur die große Gärung, sondern auch die zu kleine Atmung. Nachdem wir gefunden hatten, daß die Gärung beim Anwachsen der Zellen *in vitro* sofort erscheint, haben wir weiterhin untersucht, wann die zu kleine Atmung erscheint[8].

Nierenzellen, deren Stoffwechsel bei der Einsaat gemessen war, wurden auf 2 Zuchtflaschen verteilt, von denen die eine Sauerstoff und die andere anstelle des Sauerstoffs Argon im Gasraum enthielt. Nach 8tägiger *in vitro*-Kultur wurde der Stoffwechsel der gewachsenen Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Figur 6 zusammengestellt.

Vergleichen wir zunächst die in Sauerstoff gewachsenen Zellen mit der Einsaat, so sieht man, daß die Atmung nach 8 Tagen entkoppelt, aber noch nicht abgefallen ist zu einer Zeit, zu der die große Gärung bereits vorhanden ist. Der Abfall der Atmung erfolgt also *nicht vor* dem Anstieg der Gärung, sondern *nachher*.

Vergleichen wir aber die ohne Sauerstoff gewachsenen Zellen mit der Einsaat, so sieht man, daß die Atmung nach 8 Tagen sehr erheblich, nämlich auf $^1/_3$ des Wertes der Einsaat, gesunken ist. Sauerstoffmangel begünstigt also den Abfall der Atmung, aber in keiner Weise den Anstieg der Gärung.

Stoffwechselquotienten Q

Impfzellen

Atmung	— 10,8
Aerobe Gärung	0
Anaerobe Gärung	+ 4

Nach 8tägiger Kultur in O_2		Nach 8tägiger Kultur in Argon	
Atmung	— 10,5	Atmung	— 3,3
Aerobe Gärung	+ 11,9	Aerobe Gärung	+ 20
Anaerobe Gärung	+ 29	Anaerobe Gärung	+ 30

Abb. 6. Umschlag des Stoffwechsels bei aerober und anaerober Kultur.

Hiernach vollzieht sich der Stoffwechselumschlag bei der Krebsentstehung folgendermaßen: Sofort beim Einsetzen des ungeordneten Wachstums erscheint die Entkoppelung der Atmung und die große Gärung, erst dann folgt und begün-

stigt von Sauerstoffmangel, der Abfall der Atmung. Damit ist auch der alte Streit entschieden, was bei der Krebsentstehung früher da ist, die Gärung oder der Krebs. Es ist die Gärung, die früher da ist.

Abfall der Katalase

Zu den Fermenten der Atmung gehört, chemisch und funktionell, das Ferment Katalase, dessen Wirkungsgruppe Eisen ist und das Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff spaltet:

$$2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$$

Auch dieses Ferment nimmt bei der *in vitro*-Kultur der Nierenzellen ab[8], und zwar viel stärker als die Atmung. Nach Figur 7 sinkt der Gehalt der Nierenzellen an Katalase bei 8tägiger Kultur auf $^1/_{50}$ des Normalwerts, während nach Abb. 6 die Atmung in der gleichen Zeit nur auf $^1/_3$ des Normalwerts sinkt. Der Katalaseabfall ist also als Test des Stoffwechselumschlags empfindlicher als der Atmungsabfall.

In Klammern ist in Abb. 7 der Katalasegehalt von Asciteskrebszellen verzeichnet, das sind Krebszellen, die seit vielen Jahrzehnten im Körper der Maus ge-

	Katalasegehalt in willkürlichen Einheiten
Nierenzellen bei der Einsaat	1000
Nierenzellen nach 8tägiger Kultur	20
(Ascites-Krebszellen)	1

Abb. 7. Abfall des Katalasegehalts bei der *in vitro*-Kultur.

züchtet worden sind. Der Katalasegehalt dieser extrem virulenten Krebszellen ist so niedrig, daß er fast zu vernachlässigen ist.

Der sehr niedrige Katalasegehalt der Krebszellen, von dem wir im folgenden Gebrauch machen werden, ist nur ein anderer Ausdruck dafür, daß die Krebszellen zu den Anaerobiern gehören. Es ist seit langem bekannt[9], daß obligat anaerobe Bakterien keine Katalase haben und daß sie deshalb, wenn man sie an die Luft bringt, an Wasserstoffperoxydvergiftung zugrunde gehen.

Letzte Phase

Wenn bei der Krebsentstehung in vitro mit dem ungeordneten Wachstum die biochemischen Attribute der Krebszellen erschienen sind — der Anstieg der Gärung, der Abfall der Atmung, der Abfall der Katalase —, so wachsen die in vitro gezüchteten Zellen trotzdem bei der Rückimpfung auf Tiere nicht weiter, sondern sie müssen noch Monate, oft Jahre in vitro weitergezüchtet werden, bis die Rückimpfung erfolgreich ist; bis durch die erfolgreiche Rückimpfung bewiesen ist, daß die vorher normalen Zellen zu Krebszellen geworden sind. Was geschieht in dieser letzten langen Phase der Krebsentstehung?

Die Antwort ist, daß die jungen Kulturen bei der Rückimpfung von den Testtieren aufgelöst werden; und daß erst nach langer in vitro-Kultur die notwendige Resistenz gegen die Auflösung entwickelt wird. Die Entwicklung dieser Resistenz

ist es, was in der langen Phase der Krebsentstehung geschieht. Daß in der Tat die letzte lange Phase der Krebsentstehung in das Gebiet der Immunochemie gehört, wird dadurch bewiesen, daß man, wie in den USA von H. W. TOOLAN[17] gefunden worden ist, die lange Phase dadurch abkürzen kann, daß man die Abwehrkräfte der Testtiere durch große Dosen von Cortison oder von Röntgenstrahlen schwächt.

Anwendungen

Wozu sind solche Arbeiten gut? Was nützt es uns, wenn wir die Krebsentstehung in Phasen zerlegen können oder wenn wir wissen, daß die Krebszellen partielle Anaerobier sind? Ich möchte diese Frage an einem Beispiel beantworten und dabei von dem Katalasemangel der Krebszellen ausgehen, der ja eine Folge der Anaerobiose der Krebszellen ist.

Man kann leicht zeigen, daß Krebszellen wegen ihres Katalasemangels empfindlicher gegen Wasserstoffperoxyd sind als normale Körperzellen. Gibt man gleiche Mengen von Wasserstoffperoxyd zu Krebszellen und zu normalen Zellen, so ist nach einer Stunde der Stoffwechsel der Krebszellen verschwunden, während der Stoffwechsel der embryonalen Zellen noch vollständig erhalten ist[10]. Da man nun weiß, daß Röntgenstrahlen in Wasser, bei Gegenwart von Sauerstoff, Wasserstoffperoxyd bilden nach der Bilanzgleichung

$$O_2 + 2\,H_2O = 2\,H_2O_2$$

so lag die Idee nahe, daß Röntgenstrahlen, das wirksamste Krebstherapeutikum der Medizin, die Krebszellen durch nichts anderes schädigen als durch Wasserstoffperoxyd; und zwar selektiv, weil die Krebszellen weniger Katalase enthalten als die normalen Zellen.

Wirkung der Röntgenstrahlen

Zur Prüfung dieser Idee haben wir die Wirkung der Röntgenstrahlen auf Krebszellen mit einer neuen Anordnung untersucht[11] (Abb. 8). Ein Manometriegefäß, das die zu bestrahlende Flüssigkeit enthält, wird horizontal schnell bewegt, während von unten, durch den Glasboden, die Röntgenstrahlen eintreten. Die bestrahlte Flüssigkeit ist zunächst eine saure Lösung von Ferrosulfat, die bei Bestrahlung zu Ferrisulfat oxydiert wird. Da man durch die Arbeiten von H. FRICKE[12] und von GLOCKER, MESSNER und ROESINGER[13] weiß, wieviel Strahlenenergie notwendig ist, um 1 Mikromol Eisen zu oxydieren, so ergibt die Bestimmung des oxydierten Eisens die absorbierte Strahlenenergie. Ersetzt man dann die Eisenlösung durch eine Suspension von Krebszellen und bestrahlt genau wie vorher, mit dem gleichen Strahl und der gleichen Schüttelbewegung, so erhält man trotz komplizierter geometrischer Bedingungen mit großer Genauigkeit die beim biologischen Versuch absorbierte Strahlenenergie.

Als Maß der Strahlenwirkung der Krebszellen ist oft die Wachstumshemmung benutzt worden, die jedoch ein langwieriger und ungenauer Test ist. Wir wählten statt dessen die Gärungshemmung, deren genaue Messung nur eine Stunde be-

Abb. 8. Manometrisches Röntgenaktinometer über Röntgenröhre.

ansprucht. Sind dabei die Krebszellen in geringer Dichte und in Ringerlösung suspendiert, so genügt eine Strahlendosis von einigen 1000 r (etwa $^1/_{100}$ cal. pro cm^3), um die Gärung um 50% zu hemmen. Erhöht man die Dichte der Zellen oder ersetzt man die Ringerlösung durch Serum, so braucht man viel größere Strahlendosen zur Hemmung der Gärung; noch größere Strahlendosen braucht man, wenn man vor der Bestrahlung den Sauerstoff entfernt. Alle diese Beeinflussungen der Strahlenempfindlichkeit sind ohne weiteres verständlich, wenn die Strahlenwirkung eine indirekte ist und über das gebildete Wasserstoffperoxyd geht.

Der Beweis dafür wurde auf zwei Arten erbracht. Wurde zu den Krebszellen vor der Bestrahlung chemisch reine Katalase in sehr kleiner Menge gegeben, so sank die Strahlenempfindlichkeit sehr erheblich ab, wie die Abb. 9 zeigt.

ohne Katalase	+ 1,4 γ Katalase pro ccm	+ 7 γ Katalase pro ccm
88%	29%	17%

Abb. 9.
Gärungshemmung bei Bestrahlung mit Katalasezusatz

Daß die Katalase hier die Strahlenwirkung nicht vollständig hemmt, rührt daher, daß die Katalase nicht in die Krebszellen eindringt und außen das Wasserstoffperoxyd nicht so schnell zersetzen kann, daß nichts davon in die Zellen diffundiert.

Bei der zweiten Versuchsanordnung wurde zunächst das von den Strahlen gebildete Wasserstoffperoxyd gemessen und so die „strahlenäquivalente" Menge an Wasserstoffperoxyd bestimmt. Wurden die Krebszellen dann entweder bestrahlt oder wurde anstelle der Bestrahlung die strahlenäquivalente Menge an Wasserstoffperoxyd zugesetzt, so wurden beidemal die gleichen Gärungshemmungen gefunden, wie die Abb. 10 zeigt.

Wir fanden also, daß die Bestrahlung ersetzt werden kann durch die strahlenäquivalente Menge an Wasserstoffperoxyd, womit bewiesen war, daß die Strahlen nur durch das Wasserstoffperoxyd wirken, das sie in den Zellsuspensionen erzeugen. Dies gilt natürlich zunächst nur für den Vorgang, für den es gefunden worden ist, also für die Gärungshemmung der Krebszellen. Aber überall, wo Sauerstoff für die Strahlenwirkung notwendig ist, wird man in Zukunft den Weg über das Wasserstoffperoxyd für wahrscheinlich halten müssen. Es kommt dabei nicht darauf an, ob die Strahlendosen groß oder klein sind.

Bestrahlungszeiten	4′	6′	8′
Gärungshemmungen	62%	81%	95%
Bestrahlungszeiten	0′	0′	0′
Gärungshemmungen durch das strahlenäquivalente H_2O_2	60%	83%	91%

Abb. 10. Gärungshemmung durch Bestrahlung oder durch die strahlenäquivalente Menge an Wasserstoffperoxyd.

Für die Strahlentherapie aber ergibt sich*, daß die Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen sehr erheblich steigen müßte, wenn man während der Bestrahlung die roten Blutzellen fernhalten könnte, die eine enorme Menge an Katalase enthalten. Die bestrahlten Körperteile müßten also während der Bestrahlung mit einer Flüssigkeit durchströmt werden, die frei von roten Blutzellen wäre und trotzdem überschüssigen Sauerstoff enthielte, keine leichte, aber meines Erachtens heute technisch lösbare Aufgabe. Die normalen Zellen würden dabei nicht in gleichem Maß strahlenempfindlicher werden, da sie ja selbst reichlich Katalase enthalten.

Hier also haben Sie ein Beispiel einer möglichen Anwendung. Oder einige andere Beispiele:

Dean Burk[14] findet, daß alle Chemotherapeutika des Krebses in therapeutischen Dosen die Gärung der Krebszellen hemmen.

Helmut Holzer[15] findet, daß Chemotherapeutika des Krebses wie E 39 der Farbwerke Bayer die Konzentration des Nikotinsäureamids in den Krebszellen herabdrücken. Nikotinsäureamid aber, 1934 in Dahlem entdeckt, ist bekanntlich die Wirkungsgruppe der wasserstoffübertragenden Gärungsfermente.

Charles Huggins und Paul Talalay[16] finden, daß das Sexualhormon Oestron die Bindung des Nikotinsäureamids in einer solchen Weise verschiebt, daß die Gärung fallen und die Atmung steigen muß.

Aus alledem erkennt man die zukünftige Grundlage der Therapie des Krebses. Es wird die Anaerobiose der Krebszellen sein.

References

1 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforsch. 11b (1956), 657, und 12b (1957), 115.
2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforsch. 13b (1958), 515.
3 Warburg, O., und Kubowitz, F., Biochem. Z. 189 (1927), 242.
4 Goldblatt, H., und Cameron, G., J. exptl. Med. 97 (1953), 525.
5 Sanford, K. K., Likely, G. D., und Earle, W. R., J. Nat. Cancer Inst. 15 (1954), 215.
6 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exptl. Med. 99 (1954), 167.
7 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforsch. 13b (1958), 61.
8 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A., Z. Naturforsch. 13b (1958), 588.
9 Avery, O. T., J. exptl. Med. 39 (1924), 275, 347, 357.
10 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, K., Z. Naturforsch. 12b (1957), 393.
11 Warburg, O., Schröder, W., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. Naturforsch. 13b (1958), 591.
12 Fricke, H., Amer. J. Roentgenol., Radium Therapy, Nuclear Med. 18 (1927), 426.
13 Glocker, R., Messner, D., und Roesinger, R., Z. physik. Chem. (Frankfurt) (N. S.) 13 (1957), 129.
14 Burk, D., Klin. Wochschr. 35 (1957), 1102.
15 Holzer, H., Klin. Wochschr. 36 (1958), 677.
16 Talalay, P., und Williams-Ashman, H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. 44 (1958), 15.
17 Toolan, H. W., Cancer Research 13 (1953), 389; J. Fogh und K. A. Hok, Cancer Research 18 (1958), 692.

* *Zusatz im August 1961.* Wir haben inzwischen gefunden, daß die Abtötung der Krebszellen durch Röntgenstrahlen, anders als die Gärungshemmung durch Röntgenstrahlen, nicht über Wasserstoffperoxyd geht. Es bleibt aber dabei, daß man Krebszellen durch sehr kleine Konzentrationen an Wasserstoffperoxyd abtöten kann und daß es für chemotherapeutische Zwecke einen Sinn hätte, die Blutkatalase während der Behandlung zu entfernen.

66 Über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Hämoglobin*

(Mit einer Bemerkung über die Strahlenempfindlichkeit von Gewebeschnitten)

Von Otto Warburg, Walter Schröder und H. W. Gattung

Die Methämoglobin-Bildung durch Röntgenstrahlen erfolgt durch das bei der Bestrahlung gebildete Wasserstoffperoxyd.

Wenn Röntgenstrahlen Wasser in H + OH spalten, so entsteht H_2O_2 durch zwei Reaktionen, durch die Reaktion

$$OH + OH = H_2O_2 \qquad [1]$$

und — bei Gegenwart von Sauerstoff — durch die Reaktion

$$O_2 + 2\,H = H_2O_2. \qquad [2]$$

Durch das so gebildete H_2O_2, nicht durch die Radikale H und OH, hemmen Röntgenstrahlen die Gärung von Krebszellen, wie mit Hilfe von Katalase gezeigt worden ist[1]. Offenbar reagieren OH + OH und O_2 + 2H so schnell, daß direkte Reaktionen von H oder OH mit den Gärungsfermenten so gut wie nicht vorkommen.

In dieser Arbeit wird für die Methämoglobin-Bildung durch Röntgenstrahlen gezeigt, daß auch hier die Wirkung der Strahlen über H_2O_2 geht. Am einwandfreiesten kann man dies beweisen, indem man eine neutrale Phosphatlösung ohne Hämoglobin bestrahlt und erst nach der Bestrahlung das Hämoglobin zusetzt. Dann bildet sich bei Zusatz von Hämoglobin zu der bestrahlten Lösung ebensoviel Methämoglobin, wie bei direkter Bestrahlung von Hämoglobin in der Phosphatlösung. Gibt man aber zu der bestrahlten Salzlösung zunächst Katalase — die H_2O_2 zersetzt — und erst dann das Hämoglobin, so findet man keine Bildung von Methämoglobin. Zum Beispiel betrug die prozentuale Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin für Hämoglobinlösungen, die 0,023 μMol Hämoglobineisen pro cm^3 enthielten

	Röntgendosis 10000 r (in 10 Min.)	Röntgendosis 30000 r (in 30 Min.)
Oxyhämoglobin in Phosphat bestrahlt	64% Methämoglobin	93% Methämoglobin
Phosphatlösung bestrahlt, dann Oxyhämoglobin zugesetzt	64% Methämoglobin	93% Methämoglobin

während kein Methämoglobin gefunden wurde, wenn der bestrahlten Phosphatlösung vor Zusatz des Hämoglobins Katalase zugesetzt wurde; und nur ein Bruchteil des Methämoglobins, wenn Hämoglobin unter Zusatz von Katalase bestrahlt wurde. Im ersten Fall war bei Zusatz des Hämoglobins bereits alles H_2O_2 durch die

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960): 163.

Katalase zersetzt worden. Im zweiten Fall konkurrierten Hämoglobin und Katalase während der Bestrahlung um das gebildete H_2O_2.

Wenn nun auf diese Art bewiesen ist, daß die Strahlenwirkung hier über H_2O_2 verläuft, so ergibt sich allgemein für Bestrahlungsversuche mit Hämoglobin, daß die Hämoglobin-Präparate nach Möglichkeit frei von Katalase sein sollten. Rattenhämoglobin, das bei der Hämolyse von Ratten-Erythrocyten sehr schön und schnell kristallisiert, enthält auch nach häufigem Waschen mit Wasser noch immer viel Katalase, wird aber durch mehrmaliges Umkristallisieren wesentlich katalaseärmer, wenn auch nicht frei von Katalase. Dabei steigt, wie zu erwarten war, die Strahlenempfindlichkeit zum Beispiel auf das Doppelte bis Vierfache. Abb. 1

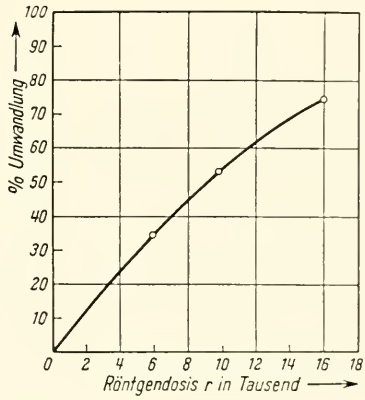


Abb. 1. Methämoglobin-Bildung von umkristallisiertem Rattenhämoglobin, gelöst in $m/10$-Phosphat pH 7,4, Konzentration 0,0295 μMol Fe/cm³. Halber Umsatz durch 9000 r.

zeigt einen Versuch, bei dem dreimal umkristallisiertes Oxyhämoglobin, in einer Konzentration von 0,029 μMol Fe/cm³, durch 9000 r zu 50% in Methämoglobin umgewandelt wurde. Erhöht man die Konzentration des Hämoglobins, so steigt die für gleiche prozentische Umwandlung notwendige Strahlendosis, weil dann absolut mehr Hämoglobin oxydiert werden muß. Zum Beispiel stieg, wenn die Hämoglobin-Konzentration von 0,029 auf 0,118 μMol Fe/cm³ erhöht wurde, die für 50% Methämoglobin-Bildung notwendige Strahlendosis von 9000 auf 35000 r.

Die „Ausbeute" bei der Umwandlung in Methämoglobin kann man berechnen, indem man das oxydierte Hämoglobineisen dividiert durch das oxydierte Aktinometereisen, das die Spaltungsprodukte des Wassers quantitativ erfaßt. Man findet dann die

$$\text{Ausbeute} = \frac{\text{oxydiertes Hämoglobin-Fe}}{\text{oxydiertes Aktinometer-Fe}} = \sim 0{,}1,$$

wobei zu bedenken ist, daß H_2O_2 nicht nur das Eisen des Hämoglobins, sondern auch die SH-Gruppen des Globins oxydiert[2]; daß ein Teil des gebildeten H_2O_2 durch den Katalasegehalt des Hämoglobins verloren geht, während der eigentliche Verlust an Oxydations-Äquivalenten von der Rückreaktion $H + OH = H_2O$ herrührt (die im Eisenaktinometer zu vernachlässigen ist).

Als Beispiel einer biologischen Anwendung sei die Strahlenempfindlichkeit der Entenerythrocyten angeführt. Daß diese Erythrocyten ausnahmsweise arm an

Katalase sind, entnehmen wir einer Arbeit von KASIRA und Mitarbeitern[3], auf die uns Herr RICHARD KUHN aufmerksam machte.

Abb. 2 zeigt den großen Unterschied im Katalasegehalt von Ratten- und Enten-Erythrocyten. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß, der Erwartung entsprechend, Entenerythrocyten viel strahlenempfindlicher sind als Rattenerythrocyten.

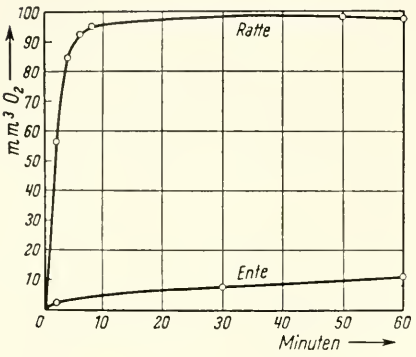


Abb. 2. Vergleich der H_2O_2-Zersetzung durch Ratten- und Enten-Erythrocyten. Hauptraum: 3 mm³ rote Blutzellen von Ratte oder Ente, suspendiert in 3 cm³ 0,9-proz. NaCl-Lösung. Birne etwa 10 μMole H_2O_2. Gasraum Luft. 20°. Bei $t = 0$ wurde das H_2O_2 in den Hauptraum gegeben.

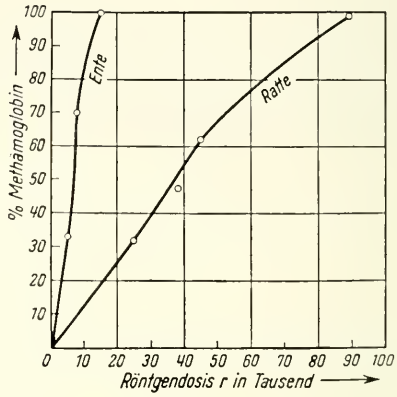


Abb. 3. Methämoglobin-Bildung durch Röntgenstrahlen in Ratten- und Enten-Erythrocyten. Bei der Bestrahlung im Aktinometer enthielt der Hauptraum je 1,3 mm³ rote Blutzellen, suspendiert in 3 cm³ 0,9-proz. NaCl-Lösung, der Gasraum enthielt Sauerstoff, die Temperatur war 20°. Dosis halber Umwandlung für Entenzellen ~ 5000 r, für Rattenzellen ~ 35000 r.

Strahlenempfindlichkeit von Gewebeschnitten

Während sich bisher bei Bestrahlung von Einzelzellen ergeben hat, daß die Strahlenwirkung über H_2O_2 geht, läßt sich aus Bestrahlungsversuchen mit Geweben oder Gewebeschnitten zunächst nicht das gleiche schließen.

Daß sich Einzelzellen und Gewebeschnitte bei Bestrahlungsversuchen verschieden verhalten, kann besonders überzeugend mit Hilfe des Ehrlichschen Mäusecarcinoms gezeigt werden, das je nach der Impfung in die Bauchhöhle oder unter die Haut, als Einzelzellen oder als solide Tumoren wächst.

Wurden nun aus dem gleichen Impfmaterial gezüchtete Zellen als Einzelzellen oder als Gewebeschnitte bestrahlt, so war etwa die 3fache Strahlendosis zur Gärungs-Hemmung der Schnitte notwendig als zur Gärungshemmung der Einzelzellen. Es war ferner die Gärungshemmung der Schnitte, anders als die Gärungshemmung der Einzelzellen, fast unabhängig von dem Flüssigkeitsvolumen, in dem das Material suspendiert war; und es hatte Zusatz von Katalase, anders als Zusatz von Katalase zu Einzelzellen, keinen Einfluß auf die Strahlenwirkung.

Gewebeschnitte verhalten sich also bei Bestrahlungsversuchen, als ob die Strahlen direkt und nicht über H_2O_2 wirkten. Da man aber nicht annehmen kann, daß die Strahlen auf Einzelzellen und auf Gewebeschnitte derselben Zellart durch einen

verschiedenen chemischen Mechanismus wirken, so muß man sich fragen, woher das verschiedene Verhalten von Einzelzellen und Gewebeschnitten in unsern Versuchen herrührt.

Wahrscheinlich ist die Ursache der 20- bis 40mal längere Diffusionsweg von der Oberfläche in das Innere der Gewebeschnitte, der bewirkt, daß H_2O_2, das von außen in die Schnitte eindringt, durch die Katalase der Schnitte bereits in den Außenbezirken zersetzt wird. So kann, bei Bestrahlungsversuchen mit Gewebeschnitten, wesentlich nur das innerhalb der Schnitte gebildete H_2O_2 zur Wirkung kommen. Im Körper jedoch, wo dank des Kapillarkreislaufs die Diffusionswege kurz sind, werden sich die Gewebezellen so verhalten, wie bei unsern Versuchen die Einzelzellen.

Versuchsanordnung

Alle Bestrahlungen wurden in unserem Röntgenaktinometer[4] vorgenommen, bei Sättigung mit Luft oder Sauerstoff, und bei vollständiger Ausleuchtung mit der Röhre R T 100 von C. H. F. Müller-Hamburg (100 kV, 8 mA, 1,7 mm Al-Filter, 5 oder 9,5 cm Fokusabstand bis zum Boden des Bestrahlungsgefäßes). Die Strahlendosis wurde in demselben Aktinometergefäß mit der luftgesättigten sauren Ferrosulfatlösung nach FRICKE bestimmt. Zur Umrechnung des Eisenwertes in r-Einheiten wurde angenommen, daß 60000 r ein μMol Eisen oxydieren.

Die Konzentration an Oxyhämoglobin war bei unsern Versuchen in der Regel 0,023 Mikromol Eisen/cm^3. Je nach dem Katalasegehalt des Präparats benötigten wir dann 5000 bis 20000 r zur halben Umwandlung in Methämoglobin. War die Konzentration des Oxyhämoglobins doppelt so groß, so benötigt man zur gleichen prozentischen Umwandlung doppelt soviel r.

Bei Versuchen mit roten Blutzellen, die in 0,9proz. Kochsalzlösung gewaschen und suspendiert wurden, betrug die Konzentration an Zellen in der Regel 1,3 mm^3 Zellen/cm^3. Das Blut wurde also sehr stark verdünnt. Würde man mit der Zellkonzentration des Blutes arbeiten, die 8 Mikromole Hämoglobineisen/cm^3 beträgt, so würde man zur Umwandlung in Methämoglobin Millionen r benötigen.

Nach der Bestrahlung der Hämoglobinlösungen oder der roten Blutzellen wurde bis zum vollständigen Umsatz des H_2O_2 1 Stde. gewartet. Dann wurde das gebildete Methämoglobin optisch bei der Wellenlänge 625 mμ bestimmt. War dabei c die Konzentration des Methämoglobins, c_0 die Konzentration des Gesamthämoglobins und $\Delta \ln (i_0/i)$ die Zunahme des Logarithmus der Lichtschwächung, so war der umgewandelte Bruchteil des Hämoglobins

$$\frac{c}{c_0} = \frac{[\Delta \ln (i_0/i)]\, t}{[\Delta \ln (i_0/i)]\, t = \infty} \qquad [3]$$

wo $[\Delta \ln (i_0/i)]\, \infty$ nicht nach langer Bestrahlung, sondern nach Zusatz von Kaliumferricyanid bestimmt wurde, das die vollständige Umwandlung sehr schnell bewirkt.

Will man nicht nur das *Verhältnis* der Konzentrationen, sondern auch die *absoluten* Hämoglobin-Konzentrationen bestimmen, so benötigt man die Absorptionskonstanten β der Gleichung

$$\ln (i_0/i) = \beta \cdot c \cdot d. \qquad [4]$$

Drücken wir c in μMolen/cm^3 aus und d in cm, so erhalten wir

$$\beta = \frac{\ln (i_0/i)}{c\, d} \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mole}}\right].$$

Wir fanden	Oxyhämoglobin	Methämoglobin
λ 540	$\beta = 35{,}5$	$\beta = 20{,}3$
λ 625	$\beta = 0{,}78$	$\beta = 9{,}32$

Auch die Methämoglobin-Bildung innerhalb der roten Blutzellen wird nach Gl. (3) bestimmt, jedoch wegen der Zerstreuung nicht im Spektralphotometer, sondern in der ULBRICHTschen Kugel[5]. In diesem Fall jedoch kennt man die Länge des Lichtweges d nicht und kann also die absoluten Hämoglobin-Konzentrationen c nicht nach Gl. (4) berechnen.

Kristallisiertes Oxyhämoglobin. Die roten Blutzellen von frischen defibriniertem Rattenblut wurden auf der Zentrifuge 3mal mit 0,9proz. NaCl-Lösung gewaschen. Wurde dann das Zellsediment mit dest. Wasser auf Blutvolumen aufgefüllt und 1 Stde. bei 38^0 gehalten, so kristallisierte das Oxyhämoglobin aus. Die Kristalle wurden auf der Zentrifuge 3mal mit *m*/10-Phosphat pH 7 und dann 3mal mit Wasser gewaschen. Zum Umkristallisieren wurde in Wasser suspendiert, das Hämoglobin durch sehr wenig NH_3 in Lösung gebracht und durch Überleiten von Luft wieder ausgefällt. Die so gereinigten Kristalle enthielten nur noch wenig Katalase. Sie wurden direkt vor dem Bestrahlungsversuch in *m*/10-Phosphat pH 7,5, nötigenfalls unter Zusatz einer Spur NH_3, gelöst. Ohne NH_3 hergestellte Lösungen sind haltbarer, bei Gegenwart von NH_3 und O_2 wird langsam Methämoglobin gebildet.

Literatur

1 Warburg, O , und Schröder, W., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 591.

2 Conant, J. B., und Scott, N. D., J. biol. Chemistry 69 (1926), 575; 76 (1928), 207. Warburg, O., und Schüler, H., Biochem. Z. 255 (1932), 474.

3 Kasira, K., Kikuchi, G., Nakamura, H., und Yoshiya, M., wo die Entdeckung der seltenen Krankheit des Menschen „Anenzymia catalasea" beschrieben wird. Solche Menschen sind voraussichtlich strahlenempfindlicher als normale Menschen [Chem. Ber. 85 (1952), 886].

4 Warburg, O., Schröder, W., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 591.

5 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 9b (1954), 181.

67 Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und August-Wilhelm Geissler

Der Stoffwechsel der embryonalen Hühnerzellen ist ein reiner Oxydations-Stoffwechsel. Bei der Kultur in vitro unter Zusatz von Serum schlägt der embryonale Stoffwechsel in 48 Stunden in den Gärungsstoffwechsel der Krebszellen um.

10tägige Hühnerembryonen wurden nach Dulbecco-Vogt[1], wie früher für Nierenzellen beschrieben[2], trypsinisiert, gewaschen und mit Nährmedium + Serum auf das 400fache des Zellvolumens verdünnt. Der Bicarbonatgehalt betrug dann etwa 400 mm^3 $NaHCO_3$ pro cm^3. Diese Zellsuspension wurde in Petrischalen von 10 cm Durchmesser gegossen und in einer Atmosphäre von 5 Vol-% CO_2-Luft bei 38° gezüchtet, wobei etwa $^1/_3$ der Zellen am Boden der Schalen anwächst und sich hier in Form von Spindelzellen teilt, während die übrigen Zellen absterben und sich z. T. auflösen. Die gewachsenen Zellen wurden nach 24 oder 48 Stunden mit wenig Versen und Trypsin vom Boden der Schalen abgelöst, in Phosphat-Salzlösung gewaschen und zur Stoffwechselmessung wieder in Kulturlösung + Serum aufgenommen, der noch Bicarbonat und Glucose bis zur physiologischen Konzentration zugesetzt war. Bei der Manometrie fanden wir:

Aus dem embryonalen Stoffwechsel (Zeit Null der Züchtung)

Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	Meyerhof-Quotient
—12	0	+15	1,25

entstand bei der Züchtung in vitro (unter Zusatz von Serum) in 48 Stunden der folgende Stoffwechsel:

Kulturmedium	Züchtungsdauer [Stunden]	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	MQ
+ 50% inaktiviertes Kälberserum	24	— 6,8	+ 18	+ 46	4,1
+ 50% inkativiertes Kälberserum	48	—2 bis —4	+ 34,6	+ 49,6	3,8—7,5
+ 50% inaktiviertes Kälberserum	24	—11	+ 10,6	+ 40	2,7
+ 50% inaktiviertes Kälberserum	48	— 6	+ 20,6	+ 50	5,0
+ 50% frisches Hühnerserum	24	—11,5	+ 5,2	+ 37,8	2,8
+ 50% frisches Hühnerserum	48	—11,4	+ 12,5	+ 38,7	2,3
+ 50% frisches Hühnerserum	24	—11	+ 3,4	+ 37,4	3,1
+ 50% frisches Hühnerserum	48	— 8,3	+ 11	+ 44,2	4,0

Wir fanden also für die im Körper gewachsenen embryonalen Zellen einen reinen Oxydationsstoffwechsel, für die in vitro mit Kälberserum gewachsenen Zellen nach 48 Stunden voll ausgebildeten Krebsstoffwechsel. Dieser Krebsstoffwechsel kann nicht in einem kleinen Teil der Einsaat bereits vorhanden gewesen

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, Band 15b (1960): 378.

sein, da ein zu großer Bruchteil der Einsaat anwächst. Sät man z. B. in eine Petrischale 35 mm^3 Zellen ein und läßt sie unter Zusatz von 50 Vol.-% inaktiviertem Kälberserum wachsen, so beträgt die Ernte nach 24 Stunden 62% der Einsaat und nach 48 Stunden 100% der Einsaat. Die Idee, daß der Gärungsstoffwechsel der Krebszellen durch Selektion entsteht, muß also nunmehr aufgegeben werden.

Zusammenfassung

Aus unsern Versuchen folgt, daß in den embryonalen Zellen ein chemischer Mechanismus vorliegt, der den Gärungsstoffwechsel schnell und vererbbar erzeugen kann durch einen Vorgang, für den Mutation nicht der richtige Ausdruck wäre. Es sieht so aus, als ob die Nucleinsäuren der embryonalen Zellen ihre lange anaerobe Vorgeschichte noch nicht vergessen haben.

Unsere Versuche bestätigen ferner von neuem, daß der embryonale Stoffwechsel ein reiner Oxydations-Stoffwechsel ist. Nichts ist obligater aerob, als die embryonale Zelle der höheren Tiere, die ja gerade dem Ersatz der Gärung durch die Atmung ihrer Höherentwicklung verdankt[3]. Nur Krebszellen[4] und sie alleine sind im Körper der höheren Tiere des Lebens ohne Sauerstoff fähig.

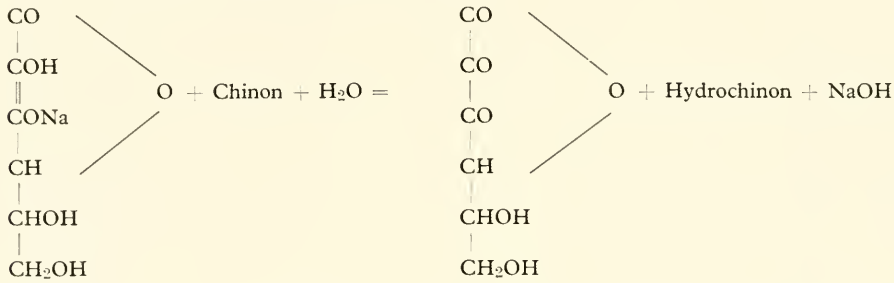
Literatur

1 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exp. Medicine 99 (1954), 167.
2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A. W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 588.
3 Nursall, J. R., Nature (London) 183 (1959), 1170.
4 Warburg, O., The Metabolism of Tumors, London (Constable) 1930 und die folgende interessante Konsequenz bei R. M. Malmgren und C. C. Flamigan, Cancer Res. 15 (1955), 473. Infiziert man gesunde Mäuse mit Tetanussporen, die nur sauerstofflos keimen können, so bleiben die Mäuse gesund. Infiziert man aber Tumormäuse mit Tetanussporen, so keimen die Sporen zwischen den Krebszellen aus, und die Tiere gehen an Tetanus zugrunde.

Manometrische Bestimmung der Ascorbinsäure*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Löst man im Hauptraum eines Manometriegefäßes einige Mikromole Na-Ascorbat in 3 ccm n/100 oder n/10 Bikarbonat, sättigt mit 20 Vol.-% CO_2-Argon, so daß pH 6,5 oder 7,5 wird, und gibt dann aus der Ansatzbirne überschüssiges Chinon in den Hauptraum, so wird bei 20° in wenigen Minuten 1 Mol CO_2 pro Mol Ascorbat aufgenommen infolge der Reaktion:



Auf die Oxydation des Ascorbats folgt eine langsamere Reaktion, die Aufspaltung des Dehydrolactons zur 2,3-Diketolactonsäure, und es wird 1 Mol CO_2 pro Mol Ascorbat in den Gasraum zurückentwickelt. Diese manometrischen Reaktionen sind in ihrer Folge so spezifisch für Ascorbinsäure, daß eine Verwechslung mit andern Substanzen kaum möglich erscheint. Die Methode ist von uns mit gutem Erfolg auf Pflanzensäfte und Grana angewandt worden. Mengen von einem halben Mikromol Ascorbinsäure können mit ihr schnell und genau bestimmt werden. Zum Beispiel fanden wir:

1. *Bei pH 7,⁻.* Im Hauptraum eines Manometriegefäßes 3 ccm n/10 $NaHCO_3$ + 12 Mikromole Na-Ascorbat (Merck), in der Ansatzbirne 20 Mikromole Benzochinon, aus Petroläther umkristallisiert, im Gasraum 20 Vol.-% CO_2-Argon, so daß pH etwa 7,5 war. Wurde das Chinon bei 20° in den Hauptraum gegeben, so waren nach einigen Minuten 263 cmm = 11,8 Mikromole CO_2 aufgenommen und nach 265 Minuten, mit einer Halbwertszeit von 50 Minuten, 266 cmm = 11,8 cmm CO_2 zurückentwickelt.

2. *Bei pH 6,5.* Im Hauptraum 3 ccm n/100 $NaHCO_3$ + 5 Mikromole Na-Ascorbat, in der Ansatzbirne 20 Mikromole Chinon, im Gasraum 20 Vol.-% CO_2-Argon, so daß pH etwa 6,5 war. Wurde das Chinon bei 20° in den Hauptraum gegeben, so waren in $2^1/_2$ Minuten 108 cmm = 4,82 Mikromole CO_2 aufgenommen. Die Rückentwicklung der CO_2 verlief hier, wegen pH 6,5, viel langsamer als in (1) und betrug nach 30 Minuten nur etwa 5% der vorher aufgenommenen CO_2.

Je nachdem man also die Rückentwicklung der CO_2 zur Kontrolle zu sehen wünscht oder nicht, wird man bei pH 7,5 oder 6,5 arbeiten.

Es ist hervorzuheben, daß Chinon hier als Oxydans besonders geeignet ist, da Hydrochinon bei pH 6,5 und 7,5 keine CO_2 aus Bikarbonat austreibt.

---

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

69 Über den Quantenbedarf der Photosynthese in Blättern*

Von O. Warburg, A. Lehmann und H. W. Gattung

Zur Messung des Quantenbedarfs grüner Blätter benutzten wir die 3-molaren Carbonatgemische, die den Kohlensäuredruck konstant halten, und bestimmten mit einer 1-Gefäßmethode[1] die Sauerstoffentwicklung im Licht. Die Manometriegefäße waren einfache hohe Kästchen, auf deren Boden ein zylindrischer Vasen-Einsatz zur Aufnahme der Blattstiele aufgeschmolzen war.**

4 ccm Carbonatgemisch + 2 mgr Cartase wurden in den Hauptraum der Manometriegefäße gegeben, deren Volumen etwa 30 ccm betrug. In dem Vasen-Einsatz, der zur Hälfte mit Wasser oder Nährlösung gefüllt war, wurde der Blattstiel mit Stahldraht so befestigt, daß das Blatt beim Schütteln der Gefäße seine Stellung nicht änderte. Waren die Manometriegefäße mit den Manometern verbunden, so wurde bei 20° mit einer Frequenz von 200 pro Minute horizontal geschüttelt, wobei sich in den Gefäßen, in Luft, schnell derjenige Kohlensäuredruck einstellte, der mit dem Carbonatgemisch im Hauptraum im Gleichgewicht war. Wir variierten dabei den Kohlensäuredruck von 5 bis 200 mm Brodie, die Zusammensetzung der zugehörigen Carbonatgemische findet man in einer kürzlich veröffentlichten Tabelle[2].***

Der im Thermostaten horizontal verlaufende Lichtstrahl traf auf das im Manometriegefäß senkrecht stehende Blatt und wurde von dem Blatt zu einem kleineren Teil reflektiert, zu einem größeren Teil absorbiert. Das in das Blatt eingestrahlte Licht wurde bolometrisch gemessen. Der von dem Blatt reflektierte und durchgelassene Bruchteil wurde mit der Ulbrichtschen Kugel gemessen, in deren Mittelpunkt das Blatt oder weißes Papier der gleichen Form montiert war. Dann war der absorbierte Bruchteil $\alpha = 1 - (R + D)$, wo R der reflektierte Bruchteil und D der durchgelassene Bruchteil ist.

Immer war der Querschnitt des auf das Blatt treffenden Lichtstrahls wesentlich kleiner als die Blattfläche, so daß der Strahl beim Bewegen der Manometriegefäße auf dem Blatt blieb. Vollständiges Ausleuchten des Blattes, das man durch einen mitgehenden Spiegel erreichen kann[3], erwies sich als nicht notwendig.

Die Tabellen 1 und 2 enthalten die Ergebnisse. Sie bestätigen die bereits bekannte Tatsache, daß die Blätter der Pflanzen das Licht viel schlechter ausnutzen als Chlorella. Am besten nutzen in unsern Versuchen ganz junge Bohnenblätter das Licht aus, die übrigens im Gegensatz zu älteren Blättern eine erhebliche Atmung haben. Aber auch in diesen jungen Blättern war die Ausnutzung des Lichts rund 3mal schlechter als in Chlorella.

---

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

** Abgebildet in Beitrag Nr. 42 dieses Buches.

*** Beitrag Nr. 79 dieses Buches.

Tabelle 1

Blattart	Spektral-bezirk	Eingestrahlte Lichtintensität (cm Quanten/min)	CO_2-Druck mm Brodie	Quantenbedarf $\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Mole } O_2}$
Weißer Kohlrabi	grün	25	5	13,6
Weißer Kohlrabi	grün	50	5	13,7
Weißer Kohlrabi	grün	25	46	15,9
Weißer Kohlrabi	grün	50	46	15,9
Blauer Kohlrabi	grün	25	5	19,5
Blauer Kohlrabi	grün	50	5	19,5
Blauer Kohlrabi	grün	25	46	22,9
Blauer Kohlrabi	grün	50	46	20,2
Freilandspinat	grün	25	5	15,6
Freilandspinat	grün	50	5	15,3
Freilandspinat	grün	35	46	11,9
Freilandspinat	grün	70	46	14,5
Futterrüben	grün	25	5	13,3
Futterrüben	grün	50	5	13,8
Futterrüben	grün	25	46	14,4
Futterrüben	grün	50	46	14,4
Brennessel	grün	25	5	13,7
Brennessel	grün	50	5	16,0
Brennessel	grün	25	46	18,6
Brennessel	grün	50	46	18,9
Kartoffel	grün	25	5	14,7
Kartoffel	grün	50	5	21,4
Kartoffel	grün	25	46	17,3
Kartoffel	grün	50	46	16,5
Schilf	grün	25	5	53,3
Schilf	grün	50	5	55,3
Pappel	grün	25	46	22,5
Pappel	grün	50	46	21,8
Linde	grün	25	46	17,5
Linde	grün	50	46	17,5
Nußbaum	grün	25	5	16,1
Nußbaum	grün	50	5	17,6
Nußbaum	grün	25	46	16,8
Nußbaum	grün	50	46	17,6
Gingkobaum	grün	25	46	18,3
Gingkobaum	grün	50	46	19,8
Tanne	grün	25	5	14,7
Tanne	grün	50	5	14,5
Tanne	grün	25	46	18,2
Tanne	grün	50	46	18,5
Wacholder	grün	25	5	15,5
Wacholder	grün	50	5	14,0
Wurmfarn	grün	25	5	16,3
Wurmfarn	grün	50	5	16,3
Wurmfarn	grün	25	46	17,7
Wurmfarn	grün	50	46	20,7
Farnmoos	grün	25	5	18,7
Farnmoos	grün	50	5	17,4
Farnmoos	grün	25	46	18,1
Farnmoos	grün	50	46	18,7

Tabelle 2

Blattart	Spektral-bezirk	Eingestrahlte Intensität (mm^3 Quanten/min)	CO_2-Druck (mm Brodie)	Quantenbedarf $\frac{1}{\varphi} = \frac{h \cdot r \text{ eingestrahlt}}{O_2 \text{ entwickelt}}$
Stangenbohne	rot	5	2	17,2
Stangenbohne	rot	5	22	10,5
Stangenbohne	rot	5	45,5	10,5
Stangenbohne	rot	5	186	10,7
Stangenbohne	rot	10	186	13,8
Stangenbohne	rot	5	750	10,9
Feuerbohne	rot	5	2	16,9
Feuerbohne	rot	5	45,5	9,4
Feuerbohne	rot	5	186	10,8
Feuerbohne	rot	10	186	13,2
Feuerbohne	rot	5	750	10,3

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 364.
2 Warburg, O., Geissler, A.-W., und Lorenz, S., Z. f. Naturforschg. 16b (1961), 283.
3 Warburg, O., Krippahl, G., Buchholz, W., und Schröder, W., Z. f. Naturforschg. 8b (1953), 675.

70 Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden*

Verbindung von Manometrie und optischer Milchsäurebestimmung

Otto Warburg, Karlfried Gawehn und A. W. Geissler

Wenn bei der Manometrie von Körperzellen Stoffwechselwerte wie zum Beispiel

$$Q_{O_2} = -5, \qquad Q^{O_2}_{\Sigma CO_2} = +5$$

gefunden werden, so ist die aerobe Gärung = 0, falls das γ der Atmung = 1 ist, aber größer als 0, fall das γ der Atmung numerisch kleiner als 1 ist. Da man nun bei der Manometrie nur die gesamte Kohlensäure, aber nicht die Atmungskohlensäure erhält, so bleibt bei der Messung der aeroben Gärung eine Unsicherheit, die bei den großen aeroben Gärungen der Krebszellen bedeutungslos ist, aber wesentlich werden kann, wenn kleine aerobe Gärungen zur Diskussion stehen.

Um in solchen Fällen jede Unsicherheit zu eliminieren, verbinden wir die Manometrie mit einer chemischen Milchsäurebestimmung, die alle andern Milchsäurebestimmungen an Spezifität übertrifft — der optischen Milchsäurebestimmung durch die Umkehrung der Gärungsreaktion

$$\text{Brenztraubensäure} + DPNH_2 \rightleftharpoons \text{Milchsäure} + DPN$$

Das Gleichgewicht dieser Gärungsreaktion

$$\frac{\text{Brenztraubensäure} \times DPNH_2}{\text{Milchsäure} \times DPN} = K$$

hängt vom pH-Wert ab und hat bei 20° folgende Werte:

pH	7,4	8,9	9,6
K	$6{,}0 \cdot 10^{-5}$	$4{,}2 \cdot 10^{-3}$	$3{,}3 \cdot 10^{-2}$

Hiernach liegt bei pH 7,4 das Gleichgewicht soweit zugunsten der Brenztraubensäure-Reduktion — die die physiologische Gärungsreaktion ist —, daß man die Rückreaktion, die Oxydation der Milchsäure, nicht zur Bestimmung der Milchsäure benutzen kann. Bei pH 9,6 jedoch, wobei DPN nicht geschädigt wurde, ist das Gleichgewicht bereits soweit zugunsten der Reaktion von rechts nach links verschoben, daß man Milchsäure zur Hälfte oxydieren kann, wenn man das Verhältnis $DPNH_2$: DPN gleich 1:30 macht — wovon man sich durch Einsetzen in die obige Gleichung des Gleichgewichts überzeuge.

Die absoluten Milchsäurekonzentrationen bei der optischen Bestimmung sind dann durch die Forderung gegeben, daß bei 340 mμ auf dem Lichtweg 1 cm im

*) Aus Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 320, S. 277-279, 1960.

Gleichgewicht I_0/I etwa 2 sein soll. Dann sind die Konzentrationen des $DPNH_2$ oder der Brenztraubensäure im Gleichgewicht durch die Beziehung gegeben

$$c = \frac{\ln I_0/I}{14} = \frac{0{,}7}{14} \left[\frac{\mu\,\text{Mol}}{\text{cm}^3}\right]$$

wo die Zahl 14 — die methodisch wichtigste Zahl der Biochemie — der Absorptionskoeffizient β des $DPNH_2$ bei 340 mμ ist.

Die Grundlagen der Methode findet man in den folgenden Veröffentlichungen unseres Instituts:

1. Entdeckung der reduzierenden Reaktion der Milchsäuregärung[1].

2. Endgültige Bestimmung der Höhe der Bande des $DPNH_2$ bei 340 mμ β = 14 cm^2/μMol, das ist der Wert, mit dem heute alle Biochemiker rechnen[2].

3. Erste Messung des Gleichgewichts der Reduktions-Reaktion der Milchsäuregärung und Entdeckung der Verschiebung des Gleichgewichts durch Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration[3].

Die Anwendung der Methode gab zunächst unbefriedigende Resultate, wenn die Zellen in Serum suspendiert waren. Serum aber, notwendig als Suspensionsflüssigkeit für Körperzellen, enthält wechselnde und so große Mengen Brenztraubensäure, daß die optischen Ausschläge für eine gegebene Milchsäuremenge wesentlich verkleinert werden, wie es die Formel des Gleichgewichts verlangt. Die optische Milchsäurebestimmung war also für unsere Zwecke nur dann anwendbar, wenn es gelang, vor der Bestimmung die Brenztraubensäure zu entfernen.

Die folgende Methode hat sich bewährt. Nach Enteiweißung mit Perchlorat stellen wir mit Carbonat-Hydrogencarbonat[4] auf pH 9,6 ein, oxydieren dann die Brenztraubensäure mit Wasserstoffperoxyd und zerstören das überschüssige Wasserstoffperoxyd mit Katalase. Erst dann setzen wir das DPN zu.

Vorschrift

Eine Suspension von Körperzellen in Serum, z. B. von Leukozyten in Serum, wird zu Beginn und am Ende einer manometrischen Stoffwechselmessung zentrifugiert, das Zentrifugat wird mit $^1/_{10}$ Vol. 35proz. $HClO_4$-Lösung enteiweißt.

0,2 cm^3 der enteiweißten Lösung, die ungefähr 0,3 μMol L-Milchsäure enthalten soll. Die Anfangskonzentration der Milchsäure beträgt dann 0,1 μMol/cm^3.
+ 2,3 cm^3 1m Carbonat-Hydrogencarbonat 1:1, pH 9,6.
+ 0,1 cm^3 0,05*m* H_2O_2 = 5 μMol. 15 Min. stehen lassen. Dann
+ 0,1 cm^3 = 20 γ Katalase (Böhringer). 15 Minuten stehen lassen. Dann
+ 0,2 cm^3 DPN-Lösung = 4,56 μMol. Die Anfangskonzentration des DPN ist dann = 1,52 μMol/cm^3.
+ 0,07 cm^3 Wasser

Σ 2,97 cm^3. Die Reaktion wird durch 0,03 cm^3 = 150γ Milchsäuredehydrogenase (Böhringer) in Gang gesetzt.

War die Anfangskonzentration der Milchsäure = 0,1 μMol/cm^3, so war für 1 cm Lichtweg bei 340 mμ I_0/I = 2,06; ln I_0/I = 0,72

$$c \text{ Brenztraubensäure} = c\, DPNH_2 = 0{,}72:14 = 0{,}051\ \mu\text{Mol/cm}^3.$$

Es war also die Hälfte der Milchsäure zu Brenztraubensäure oxydiert worden.

Im allgemeinen ist eine Berechnung des $DPNH_2$ nicht notwendig, sondern man ermittelt diejenige Menge an L-Milchsäure, die bei Zusatz zum Test den gleichen Extinktionsanstieg erzeugt wie die zu bestimmende Lösung.

Zum Beispiel fanden wir die aerobe Gärung in Parallelversuchen mit der manometrischen und optischen Milchsäurebestimmung:

Versuchszellen	manometrisch		Optisch
	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Hühner-Leukozyten in Serum	— 7,0	+ 2,0	+ 1,5
	— 6,9	+ 1,4	+ 1,4
	— 7,3	0	+ 0,4
	— 5,9	0	0
Ratten-Leukozyten in Serum	— 3,7	+ 1	+ 0,3
Embryonale Hühnerzellen nach 2tägiger in-vitro-Kultur in L. Y.-Medium + Kälberserum ...	— 3,5	+ 38,2	+ 36
desgleichen	— 6,0	+ 20,6	+ 18,9

Zusammenfassung

Milchsäure kann in Serum mit Hilfe von Milchsäure-Dehydrogenase optisch bei 340 mμ bestimmt werden, wenn man vorher die Brenztraubensäure entfernt, wozu Wasserstoffperoxyd geeignet ist.

Summary

Lactic acid in serum can be determined optically at 340 mμ with the help of lactic acid dehydrogenase, after destruction of pyruvic acid; hydrogen peroxide is suitable for this purpose.

Literatur

1 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 286 (1936) 81.
2 Haas, E., Biochem. Z. 291, (1937) 79.
3 Kubowitz, F., und Ott, P., Biochem. Z. 314, (1944) 94,
4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 15b. (1960) 364.

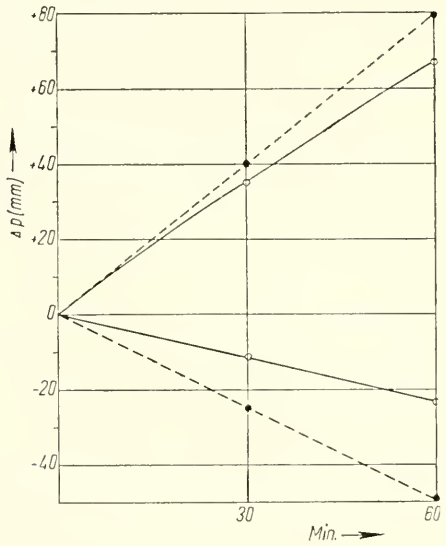
71 Über die Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn, August-Wilhelm Geissler und Siegfried Lorenz

Richard Kuhn zum 60. Geburtstag

In dieser Arbeit beschreiben wir die Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel beim Wachstum in vitro[1]. Versuchsmaterial waren Zellen, die nach der Methode von Dulbecco und Vogt[2] aus zehntägigen Hühnerembryonen gewonnen waren und in Petri-Schalen in L.Y.-Medium[1] unter Zusatz von Kälberserum gezüchtet wurden. Dabei schlägt der rein aerobe Stoffwechsel der embryonalen Zellen nach 1 bis 2 Teilungen in den Stoffwechsel von Anaerobiern um — eine der interessantesten Tatsachen, die auf dem Gebiet der chemischen Embryologie gefunden worden sind.

Wir erklären diese Umwandlung, die auffallend leicht eintritt und immer zu demselben Endzustand führt, durch die Annahme, daß diejenigen Nucleinsäuren,



Stoffwechsel der embryonalen Zellen vor (negative Drucke) und nach der Umwandlung (positive Drucke). Großes Gefäß: ————; kleines Gefäß: - - - - -.

Züchtung: In L. Y.-Medium unter Zusatz von 50 Vol.-% inaktiviertem Kälberserum bei 38° in einer Atmosphäre von 5Vol.-% CO_2 in Luft.

Manometrie: Zweigefäßmethode; in L. Y.-Medium unter Zusatz von 20 Vol.-% inaktiviertem Kälberserum, außerdem Zusatz von 1,5 mg Glukose/cm³ und von $NaHCO_3$ bis 400 mm³/cm³, Gasraum 5 Vol.-% CO_2 in Luft, pH 7,3. 5 mg Trockensubstanz pro Gefäß.

	v(cm³)		Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$
	Kl. Gef.	Gr. Gef.		
Negative Kurven	16,26	23,34	—12,1	0
Positive Kurven	15,21	20,67	— 4,2	+31,8

Das Volumen der retinierenden Flüssigkeit betrug in allen 4 Fällen $v_F = 7{,}15$ cm³. Retention für CO_2 und Milchsäure: $R = 0{,}53 \left[\frac{\text{mm}^3\ CO_2}{\text{mm}}\right]$.

* Aus Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie 321 (1960): 252—257.

die über Aerobiose und Anaerobiose entscheiden, sich gegenseitig ineinander umwandeln können bis zu einem thermodynamischen Gleichgewicht, das weitgehend zugunsten der Anaerobiose liegt; daß aber im Körper ein Ungleichgewicht erzwungen wird, das die Aerobiose erzeugt.

Die Abbildung zeigt, wie der Umschlag des Stoffwechsels sich bei der Manometrie durch einen Umschlag von positiven in negative Drucke auswirkt. Es sei hinzugefügt, daß zu dem Umschlag des Stoffwechsels Wachstum gehört. Zellen, die am Boden der Petri-Schalen nicht anwachsen, teilen sich nicht und behalten in der Suspension ihren rein aeroben Stoffwechsel bis zur Auflösung in der Suspension bei.

1. Stoffwechsel der embryonalen Zellen

Im Mittel betrug das Frischgewicht der neuntägigen Hühnerembryonen 1,4 g und der zehntägigen Embryonen 2,17 g. Die Vermehrung in vivo betrug also das 1,55fache in 24 Stunden und war damit erheblicher, als das Wachstum der meisten Tumoren. Die Augen, deren Gewicht 24% des Frischgewichts betrug, wurden vor der Trypsinisierung entfernt.

Die Embryonen wurden nach DULBECCO und VOGT[2] trypsinisiert, die Zellen wurden in L.Y.-Medium unter Zusatz von 20 Vol.-% inaktiviertem Kälberserum suspendiert, ihr Stoffwechsel wurde manometrisch mit der 2-Gefäßmethode gemessen. Tab. 1, in der eine Versuchsreihe von diesem Sommer zusammengestellt

Vers. Nr.	Q_{O_2} (Atmung)	$Q_M^{O_2}$ (Aerobe Gärung)	Q_M^{Argon} (Anaerobe Gärung)	MQ (Meyerhof-Quotient)
1	— 11	0	+ 7,2	0,7
2	— 10,7	0	+ 12,3	1,2
3	— 12,8	0	+ 9,7	0,8
4	— 8,2	0	+ 14,7	1,8
5	— 8,5	0	+ 13,5	1,6
6	— 10,8	0	+ 8,7	0,8
7	— 8,1	0	+ 13,1	1,6
8	— 13,1	0	+ 12,1	0,9
9	— 4,9	0	+ 6,9	1,4
10	— 15,2	0	+ 25	1,7
11	— 12,5	0	+ 25	2,0
12	— 13,8	0	+ 17	1,2
13	— 12,0	0	+ 12,0	1,0
14	— 8,4	0	+ 6,1	0,7
15	— 14,3	0	+ 13,4	1,0
16	— 11,8	0	+ 10,9	0,9
17	— 13,4	0	+ 12,5	0,9
18	— 12,1	0	+ 14,4	1,2
19	— 10,3	0	+ 17,7	1,7
Mittel	— 11,1	0	+ 13,3	1,2

Tab. 1. Ergebnisse der manometrischen Stoffwechselmessung mit embryonalen Zellen. Manometriebedingungen wie in der Abbildung

ist, zeigt, daß die Atmung der embryonalen Zellen groß und ihre aerobe Gärung Null ist. Die Manometrie wurde in Stichproben mit der optischen Milchsäurebestimmung[3] kontrolliert und bestätigt.

Tab. 1 zeigt, daß der embryonale Stoffwechsel ein rein aerober Stoffwechsel ist, d. h. daß die embryonale Entwicklung ein rein aerober Vorgang ist, woran seit der Entdeckung des Sauerstoffs bis zur Entdeckung der Gärung der Tumoren niemand gezweifelt hat. Tatsächlich gibt es in dem Reich der Pflanzen und der Tiere nichts, was obligater aerob wäre, als die embryonale Entwicklung, die wahrscheinlich durch das Erscheinen des Sauerstoffs in der Erdatmosphäre und den Ersatz der Gärungen durch die Atmung erst ermöglicht worden ist. Dieser Schluß[4], den wir zuerst aus der Gärung der Tumoren und ihrem undifferenzierten Wachstum gezogen haben, ist kürzlich auch von NURSALL[5] aus den Tatsachen der Paläontologie gezogen worden mit der Begründung, daß beim Erscheinen des Sauerstoffs in der Erdatmosphäre die Höherentwicklung des Lebens fast plötzlich eingesetzt hat.

Von speziellen Versuchen mit Säugetierembryonen in vivo möchten wir die Dahlemer Versuche von WIND und v. ÖTTINGEN[6] anführen, die die Nabelgefäße gravider Meerschweinchen punktierten und durch chemische Milchsäurebestimmungen zeigten, daß die Embryonen keine Milchsäure an den Blutstrom abgeben, also keine aerobe Gärung haben. Wir möchten ferner anführen[7], daß tumortragende Ratten Gärungsfermente an den Blutstrom abgeben. Da aber die Fermentabgabe aus Tumorzellen[8] mit ihrer Anaerobiose zusammenhängt, so kann die Nichtabgabe von Gärungsfermenten aus Embryonen an den Blutstrom als ein Argument für die Aerobiose der Embryonen im Körper betrachtet werden. — Drittens sind hier Versuche von MALMGREEN und FLANIGAN[9] anzuführen, nach denen Tumormäuse, auch wenn die Tumoren noch klein und nicht nekrotisch sind, durch Einimpfung der obligat anaeroben Tetanussporen immer getötet werden; daß aber gravide Mäuse nach der Impfung mit Tetanussporen gesund bleiben. Offenbar beweisen diese Versuche, bei denen man die ausgekeimten Tetanusbazillen in mikroskopischen Präparaten zwischen den Tumorzellen sieht, die Anaerobiose der Tumoren im Körper, aber die Aerobiose *aller übrigen* Zellen im Körper, insbesondere auch der embryonalen Zellen. Kein besserer Versuch konnte ersonnen werden, um alle jene Behauptungen über die Anaerobiose der embryonalen Entwicklung zu widerlegen, die nichts anderes gewesen sind, als eine Polemik gegen die Gärung der Tumoren.

Wie aber verträgt sich die strikte Aerobiose der embryonalen Zellen mit ihrer anaeroben Gärung[10], die wir fast gleichzeitig mit der Tumorgärung gefunden haben? Von dieser anaeroben Gärung ist zunächst zu sagen, daß sie niemals im Leben manifest werden kann, da die Atmung der embryonalen Zellen zu groß ist, um in dem mit Sauerstoff gesättigten Körper der höheren Tiere eine Gärung übrig zu lassen. Ferner kann die anaerobe Gärung keine allgemeine Eigenschaft des Wachstums sein, da DEAN BURK[11] gefunden hat, daß die nach Teilamputation schnell regenerierende Leber keine wesentliche anaerobe Gärung hat. Unseres Erachtens ist der Schlüssel zu dem Problem die Tatsache, daß die anaerobe, die „latente" Gärung der Embryonen um so größer ist, je weiter man in die Ontogenese der Embryonen zurückgeht. Dies legt die Idee nahe, daß die anaerobe

latente Gärung der Embryonen eine Erinnerung an die lange anaerobe Vorgeschichte ist oder im Sinne unserer Einleitung ausgedrückt: daß diejenigen Nucleinsäuren, die über Aerobiose und Anaerobiose entscheiden, zu Beginn der Ontogenese noch nicht vollständig in Richtung der Aerobiose reagiert haben. Die große Atmung ist bereits zu Beginn der Ontogenese erreicht; aber die große Gärung (aus der Zeit der Anaerobiose) ist noch im Verschwinden begriffen.

2. Entstehung des Krebsstoffwechsels

Suspendiert man die nach DULBECCO und VOGT erhaltenen embryonalen Zellen in L.Y.-Medium ohne Zusatz von Serum, und sät man die Suspensionen in Petrischalen ein, so wachsen die Zellen langsam und haben nach 2 Tagen bereits eine große anaerobe Gärung, aber noch immer eine große Atmung, so daß die aerobe Gärung Null und der Stoffwechsel noch immer der Stoffwechsel von Aerobiern ist. Setzt man beim Wachstum Serum zu, so wachsen die Zellen schneller, die anaerobe Gärung steigt höher, die Atmung aber sinkt nunmehr und zwar so stark, daß eine große aerobe Gärung übrig bleibt und nach 2 Tagen der Krebsstoffwechsel voll ausgebildet ist. Da 50 Vol.-% Serum das Maximum der Serumwirkung ergab und da inaktiviertes Kälberserum das wirksamste Serum war, zum Beispiel wirksamer als Hühnerserum, so haben wir in unsern endgültigen Versuchen mit 50 Vol.-% Kälberserum gearbeitet. In Tab. 2 ist eine Versuchsreihe wiedergegeben.

Vers. Nr.	Q_{O_2} (Atmung)	$Q_M^{O_2}$ (Aerobe Gärung)	Q_M^{Argon} (Anaerobe Gärung)	MQ (Meyerhof-Quotient)
1	— 2,2	+ 31,4	+ 33,0	Da die
2	— 3,0	+ 28,7	+ 40,0	kleinen
3	— 1,1	+ 35,0	+ 49,6	Atmungen
4	— 1,3	+ 33,8	+ 50,0	zu ungenau
5	— 3,4	+ 31,7	+ 39,5	erhalten
6	— 6,5	+ 24,6	+ 37,8	werden,
7	— 3,5	+ 38,2	+ 55,7	hat nur der
8	— 4,5	+ 31,5	+ 53,5	Mittelwert
9	— 6,0	+ 20,6	+ 50,0	Bedeutung*
10	— 7,2	+ 19,2	+ 39,0	
11	— 8,5	+ 29,3	+ 47,0	
Mittel	— 4,3	+ 29,4	+ 45,0	$\frac{45-29,4}{4,3} = 3,64$
Mittelwerte für embryonale Zellen aus Tab. 1	— 11,1	0	+ 13,3	1,2

Tab. 2. Stoffwechsel nach zweitägigem Wachstum bei 38° in L.Y.-Medium mit Zusatz von 50 Vol.-% Kälberserum. Bedingungen der Züchtung und der Manometrie wie in der Abbildung

* DEAN BURK hat uns darauf aufmerksam gemacht, daß man die Atmung der Krebszellen sehr einfach und genau mit unserer neuen Methode messen kann (Z. Naturforschg. 15b [1960]: 364), bei der Carbonatgemische in einem Anhänger der Manometriegefäße den Kohlensäuredruck konstant halten und die Krebszellen sich in ihrem physiologischen Medium im Hauptraum befinden.

Schreibt man die Mittelwerte der Tabellen 1 und 2 untereinander (vgl. Tab. 2, letzte Zeile), so sieht man, daß beim Wachstum in vitro die anaerobe Gärung von 13 auf 45 gestiegen ist, daß die Atmung von 11 auf 4 gefallen ist, und daß eine große aerobe Gärung erschienen ist. Dies ist sehr nahe der Stoffwechsel, den man für Ascites-Krebszellen der Maus bei der Messung in Serum findet. Auch der Meyerhof-Quotient ist der gleiche, wie für Ascites-Krebszellen und wesentlich höher, als für die embryonalen Zellen. Tatsächlich sind die niedrigen Meyerhof-Quotienten der Krebszellen, die früher bei Messungen in Salzlösungen gefunden wurden, vollständig verschwunden, seit der Stoffwechsel in Serum gemessen wird. Möge der „Pasteur-Defekt" der Krebszellen, der eine Entkoppelung durch Salzlösungen war, nunmehr aus der Literatur verschwinden.

Implantiert man die in vitro gewachsenen gärenden Zellen subkutan in 3 bis 5tägige Hühnerküken, so wachsen solide formlose Knoten, die aber bald wieder resorbiert werden. Es ist wahrscheinlich, daß bei der Implantation der gärenden Zellen in den Körper die Gärung wieder verschwindet, daß also die Umwandlung der embryonalen Zellen in gärende Zellen im Sinne unserer Annahmen zunächst reversibel ist. Später muß die Reversion aus irgendeinem Grund unmöglich werden, sonst könnten keine gärenden Zellen im Körper wachsen, das heißt, es könnte keinen Krebs geben.

Schließlich sei noch bemerkt, daß bei zweitägigem Wachstum in vitro, bei dem der Gärungsstoffwechsel entsteht, der Gehalt der Zellen an Katalase nicht sinkt. Vor und nach der Kultur in vitro war $\underline{Q}$ Katalase im Mittel 15 und somit etwa 20mal so groß[12] wie in den Ascites-Krebszellen der Maus.

Zusammenfassung

Züchtet man embryonale Hühnerzellen in vitro nach Dulbecco und Vogt, so entsteht im Lauf von 1 bis 2 Zellteilungen aus dem rein aeroben embryonalen Stoffwechsel der Gärungsstoffwechsel der Krebszellen.

Summary

If embryonal chicken cells are cultured in vitro according to the method of Dulbecco and Vogt, the purely aerobic embryonal metabolism changes, in the course of 1 to 2 cell divisions, to the fermentative metabolism of cancer cells.

Literatur

1 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. Naturforsch. 13b (1958), 61, 588; 15b (1960), 378.
2 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exp. Medicine 99 (1954), 167.
3 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., diese Z. 320 (1960), 277.
4 Warburg, O., und Mitarbeiter, Arch. Biochem. Biophysics 78 (1958), 573.
5 Nursall, J. R., Nature (London) 183 (1959), 1170.
6 Wind, F., und Öttingen, K. v., Biochem. Z. 197 (1928), 170.
7 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 314 (1943), 399; Sibley, J. A., und Lehninger, A. L., J. nat. Cancer Inst. 9 (1949), 303; Baker R., und Govan, D., Cancer Res. 13 (1954), 141.
8 Warburg, O., Gawehn, K., und Lange, G., Z. Naturforsch. 9b (1954), 109.
9 Malmgreen, R. M., und Flanigan, C. C., Cancer Res. 15 (1955), 473, sowie briefliche Mitteilung von Flanigan C. C., bez. der graviden Tiere.
10 Warburg, O., Metabolism of Tumors, Constable London 1930.
11 Burk, Dean, Symposium of Respiratory Enzymes, University of Wisconsin Press, Madison 1942.
12 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. Naturforsch. 13b (1958), 588.

72 Weiterentwicklung der manometrischen Methoden*

(Herstellung definierter Blausäure-Konzentrationen)

Von Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

Die Blausäure wird in den Manometriegefäßen nach beendeter Gasdurchleitung und nach dem Schließen der Hähne aus Quecksilbercyanid entwickelt.

Da Blausäure flüchtig ist, und also zugesetzte Blausäure bei manometrischen Versuchen während des Gasdurchleitens ausgetrieben wird, war die Herstellung definierter Blausäure-Konzentrationen bei der Manometrie bisher im allgemeinen nicht möglich. Mit Hilfe der neuen Wannengefäße[1] (Abb. 1) kann dem auf folgende Weise abgeholfen werden.

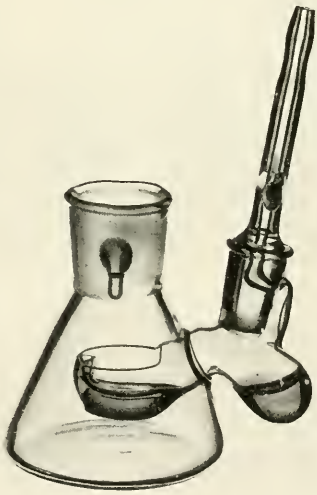


Abb. 1. Wannengefäß. 0,2 cm^3 $Hg(CN)_2$-Lösung in der Wanne, 0,2 cm^3 10-proz. NaCl-Lösung in 5-*n*. H_2SO_4 in der mit der Wanne verbundenen Birne, im Hauptraum ~ 3 cm^3 Zellsuspension.

Wir geben in die Wanne eine wäßrige Lösung von Quecksilbercyanid (das unter den Bedingungen der Manometrie nicht flüchtig ist), in die mit der Wanne verbundene Birne eine stark schwefelsaure Kochsalzlösung, leiten (beliebig lange)

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960): 625.

Gas durch die Manometriegefäße, schließen die Hähne und geben erst dann, nach beendeter Gasdurchleitung und nach Schließen der Hähne, die saure Kochsalzlösung aus der Birne in die Wanne, wobei durch die Reaktion:

$$Hg(CN)_2 + 2\,HCl = Hg(Cl)_2 + 2\,HCN$$

die Blausäure in die Manometriegefäße entwickelt wird. Nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichts befindet sich dann der größte Teil der Blausäure im Hauptraum, falls das Flüssigkeitsvolumen im Hauptraum groß ist gegen das Flüssigkeitsvolumen in der Wanne.

Denn ist a das Flüssigkeitsvolumen im Hauptraum und b das Flüssigkeitsvolumen in der Wanne + Birne und werden x μMole CN als $Hg(CN)_2$ in die Wanne gegeben, so befinden sich nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts

$$x \cdot \frac{a}{a+b}\ \mu\text{Mole HCN} \qquad [1]$$

in a im Hauptraum. Die Konzentration der Blausäure in a im Hauptraum beträgt dann

$$c = \frac{x}{a+b}\left[\frac{\mu\text{Mole HCN}}{\text{cm}^3}\right]. \qquad [2]$$

Der Bunsensche Absorptionskoeffizient der Blausäure[2] ist bei 20° $a = 240$, so daß bei dieser Rechnung die HCN im Gasraum vernachlässigt werden kann.

Zum Beispiel waren die Volumina und Substanzmengen:

Flüssigkeitsvolumen im Hauptraum 4,0 cm³ (Wasser),

Flüssigkeitsvolumen in der Wanne 0,2 cm³ $\frac{m}{50}$ — Hg $(CN)_2$ = 4,0 μMole Hg $(CN)_2$,

Flüssigkeitsvolumen in der Birne 0,2 cm³ (10% NaCl, 5-n. H_2SO_4).

Nach Einkippen der sauren NaCl-Lösung in die Wanne und 10 Minuten Schütteln ergab die Titration der HCN in a im Hauptraum (nach *Liebig* mit Silbernitrat und KJ) 7,1 μMole HCN, während nach [1] berechnet waren

$$8 \cdot \frac{4}{4+0{,}4} = 7{,}26\ \mu\text{Mole HCN}.$$

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 14b (1959), 561.
2 Warburg, O., Biochem. Z. 189 (1927), 354.

73 Weiterentwicklung der manometrischen Methoden*

(Universalgefäße)

Von Otto Warburg und Günter Krippahl

In der Abbildung 1 ist das Universalgefäß I in 2 Ansichten abgebildet. Es trägt eine einfache Birne A und eine siamesische Birne B, die beide mit dem Hauptraum verbunden sind, sowie eine weitere einfache Birne, die mit der Wanne[1] verbunden ist.

Mit Hilfe dieses Gefäßes kann man 3 Gase in dem Gefäß entstehen lassen, ohne das Gefäß zu öffnen. Zum Beispiel kann man in der siamesischen Birne B

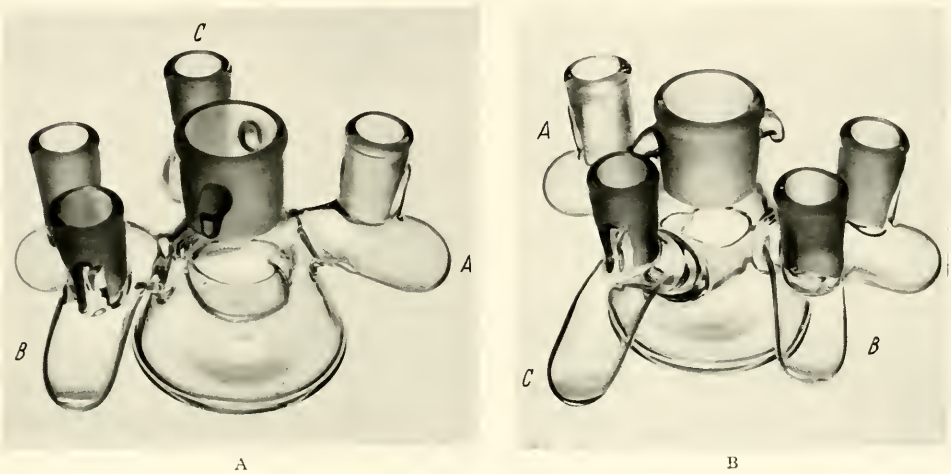


Abb. 1. 2 Ansichten des Universalgefäßes I.
A Birne, die mit dem Hauptraum verbunden ist. B Siamesische Birne, die mit dem Hauptraum verbunden ist. C Birne, die mit der Wanne verbunden ist.

aus $KMnO_4 + H_2O_2$ Sauerstoff entwickeln, in der Wanne nach Gewitz und Völker[2] aus $Hg(CN)_2$ Blausäure entwickeln und durch Einkippen von Fluorid aus Birne A in den Hauptraum z. B. Kohlensäure entwickeln. Oder man kann in der siamesischen Birne Sauerstoff entwickeln und später den Sauerstoff, indem man in der Wanne Wasser auf trockenes $Cr\ Cl_2$ gießt, wieder absorbieren. Oder man kann Kohlensäure in der siamesischen Birne entwickeln und später die Kohlensäure in der Wanne wieder absorbieren, indem man $KMnO_4$ zu Ferrocyanid gibt.

In Abbildung 2 ist das Universalgefäß II abgebildet. Es trägt eine einfache, mit dem Hauptraum verbundene Birne A und eine mit der Wanne verbundene Birne C. Es trägt ferner[3] den Anhänger B, der durch einen breiten Gang mit dem Hauptraum verbunden ist. Der Anhänger enthält 3 cm^3 Carbonat-Bicarbonatgemisch,

* Erscheint nicht an anderer Stelle.

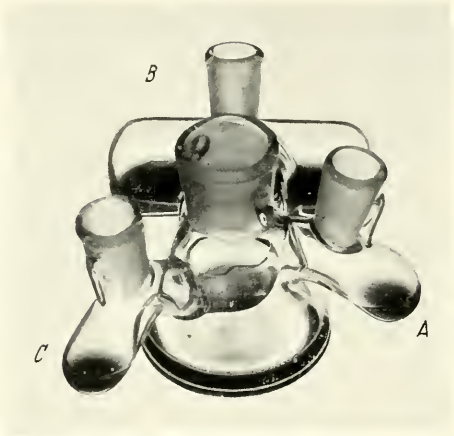


Abb. 2. Universalgefäß II. A Birne, die mit dem Hauptraum verbunden ist. B Anhänger, der mit dem Hauptraum verbunden ist. C Birne, die mit der Wanne verbunden ist.

dem das Ferment Cartase zugesetzt ist, und dient zur Konstanthaltung des Kohlensäuredrucks.

Mit Hilfe dieses Gefäßes kann man bei konstantem Kohlensäuredruck z. B. Sauerstoff entwickeln, indem man aus Birne A Wasserstoffperoxyd in den Hauptraum gibt, der Katalase enthält. Man kann später den Sauerstoff wieder absorbieren, indem man aus Birne C trockenes $CrCl_2$ in die Wanne, in Wasser, gibt. Oder man kann, wie oben, Sauerstoff entwickeln und nach GEWITZ und VÖLKER Blausäure in der Wanne entwickeln.

Literatur

1 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. f. Naturforschg. 14b (1959), 561.
2 GEWITZ, H. S., und VÖLKER, W., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 625.
3 WARBURG, O., und KRIPPAHL, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 364.

74 Stoffwechsel der Zellen des trypsinisierten Knochenmarks*

Von Tullio Terranova und Karlfried Gawehn

Da die Blutzellen im Blut mehr oder weniger schnell zugrundegehen, so kann man durch Stoffwechselversuche mit den Zellen des strömenden Blutes nicht entscheiden, ob die Blutzellen mit dem Stoffwechsel der embryonalen Zellen oder mit dem Stoffwechsel der Krebszellen wachsen. Offenbar kann man diese Frage, die oft diskutiert worden ist, nur durch Stoffwechselversuche mit Knochenmarkzellen, das heißt mit wachsenden Blutzellen entscheiden.

Wir haben derartige Versuche auf Vorschlag von Herrn Warburg ausgeführt und dabei zunächst die Versuche von Fujita[1 2] aus diesem Institut bestätigt, der fand, daß die Knochenmarkzellen, wenn man sie mit Serum herauslöst und in Serum manometrisch mißt, embryonalen Stoffwechsel und keinen Krebsstoffwechsel haben.

Wir haben die Versuchsanordnung von Fujita wesentlich dadurch verbessert, daß wir das Knochenmark nach Dulbecco-Vogt[3] trypsinisierten. Anders als beim Herauslösen der Zellen ohne Trypsin erhielten wir Erythroblasten und Myeloblasten, die auf der Zentrifuge ohne Schädigung gewaschen werden konnten und deren Stoffwechsel bei der Manometrie über längere Zeit konstant blieb. Die so erhaltenen Zellen, die zu einem Drittel aus Erythroblasten und zu zwei Drittel aus Myeloblasten bestanden, hatten den reinen Oxydationsstoffwechsel der embryonalen Zellen, also keinen Krebsstoffwechsel.

Die Theorie, daß die Blutzellen partiell anaerob wie die Krebszellen wachsen, stammt von der aeroben Milchsäurebildung der Säugetier-Erythrocyten, die bei der Reifung mit ihrem Kern auch ihre Atmung verlieren[1] und dann aerob Milchsäure bilden. Doch folgt daraus offenbar nichts für das Wachstum, da die aerobe Milchsäurebildung *erst beim Verlust* der Wachstumsfähigkeit auftritt und zum Beispiel in den kernhaltigen Vogelerythrocyten nicht erscheint.[1]

Ebensowenig würde aus einer aeroben Milchsäurebildung der weißen Blutzellen im strömenden Blut für das Wachstum der weißen Blutzellen etwas folgen, da auch die weißen Blutzellen im Blut — viel schneller als die roten Blutzellen — absterben. Doch müssen wir dazu bemerken, daß wir für die weißen Blutzellen auch im strömenden Blut keinen Krebsstoffwechsel gefunden haben[1].

Wie nun der Stoffwechsel der verschiedenen Arten von weißen Blutzellen im strömenden Blut auch sein mag, jedenfalls ist durch unsere Versuche mit dem trypsinisierten Knochenmark bewiesen, daß der Stoffwechsel der wachsenden Blutzellen, der roten und der weißen, in gesunden Tieren ein embryonaler Stoffwechsel und kein Krebsstoffwechsel ist.**

---

* Nicht an anderer Stelle veröffentlicht.

** *Zusatz August 1961.* Es wäre nunmehr interessant zu untersuchen, ob die Zellen des leukämischen Knochenmarks embryonalen Stoffwechsel oder Krebsstoffwechsel haben.

Versuchsanordnung

Wir wählten als Versuchstiere junge Ratten, die durch Dekapitieren getötet wurden. Die Knochenmarkzellen wurden nach Behandlung mit Trypsin bei 37° zentrifugiert und in inaktiviertem Rattenblutplasma (Rattenblut wurde mit Heparin entnommen) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in die Manometriegefäße eingefüllt und der Stoffwechsel nach Zusatz von Glukose und Laktat und nach Sättigung mit 5% CO_2-Luft bei 38° gemessen.

Man erhält für beide Gefäße der 2-Gefäß-Methode negative Drucke, so wie für andere normale Körperzellen.[5] Wir haben den Stoffwechsel auch in Serum bei Gegenwart von Trypsin gemessen, um den Einfluß des Trypsins während des Stoffwechsels zu beobachten. Auch in diesem Fall erhielten wir einen reinen Atmungsstoffwechsel. In Ringerlösung dagegen ist der Stoffwechsel fast Null.

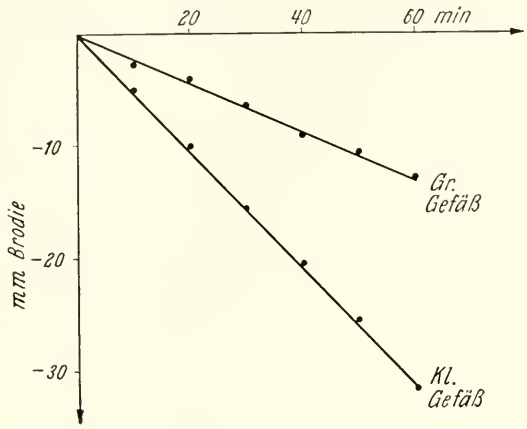


Abb. 1. Manometrie von Knochenmarkzellen der Ratte in inaktiviertem Plasma.

In Tab. 1 und Tab. 2 sind einige Stoffwechselversuche aufgeführt, die deutlich zeigen, daß die Knochenmarkzellen einen Oxydationsstoffwechsel besitzen.

Versuch Nr.	Q_{O_2}	Q_{CO_2} (Gesamt-CO_2)	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}
1	— 4,4	+ 4,4	0	+ 11
2	— 5,1	+ 4,7	0	+ 17,9
3	— 5,6	+ 6,6	+ 1	+ 15

Tab. 1. Stoffwechsel von Knochenmarkzellen der Ratte in inaktiviertem Rattenblutplasma

Versuch Nr.	Q_{O_2}	Q_{CO_2} (Gesamt-CO_2)	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}
1	— 6,8	+ 6,5	0	+ 10,6
2	— 6,8	+ 6,5	0	+ 12,2
3	— 8,5	+ 9,1	+ 0,6	+ 18,5

Tab. 2. Stoffwechsel von Knochenmarkzellen der Ratte in $^2/_3$ vol inaktiviertem Rattenblutplasma und $^1/_3$ vol 0,25%iger Trypsinlösung in Phosphatsalzlösung

Protokoll

Material: Femur- und Tibiamark von 2 jungen Ratten wurden mit Hilfe von Glasstäbchen herausgeschoben und in Phosphatsalzlösung$_6$ gewaschen. Die Knochenmarkstücke wurden dann in eine Lösung von 0,25% Trypsin in Phosphatsalzlösung$_6$ gebracht und bei 37^0 stehen gelassen. Die Zellsuspension wurde öfters umgeschüttelt, die freigesetzten Zellen wurden alle 10 Minuten abgegossen und durch frische Trypsinlösung ersetzt bis die Knochenmarkstücke vollständig in Einzelzellen zerteilt waren. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch Gaze filtriert und 10 Minuten bei 285 g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden dann mit inaktiviertem Rattenblutplasma aufgenommen und in die Manometriegefäße eingefüllt.

Stoffwechselmedium: 7,0 cm^3 Zellsuspension
0,25 cm^3 L(-) Na-lactat = 5 mg
0,1 cm^3 10%ige Glukoselösung = 10 mg.

Manometrie: 38^0, Schüttelfrequenz 170/min, Retention für 7,0 cm^3 inaktiviertes Rattenblutplasma = 0,8 mm^3 CO_2 pro mm. Zelltrockengewicht pro Gefäß: 9,35 mg.

a) *Aerob:* 5% CO_2-Luft, 2-Gefäß-Methode

Kleines Gefäß	Großes Gefäß
V = 16,02 cm^3	V = 23,34 cm^3
V_F = 7,35 cm^3	V_F = 7,35 cm^3
k_{CO2} = 1,179 mm^2	k_{CO2} = 1,822 mm^2
$k^R_{CO_2}$ = 1,979 mm^2	$k^R_{CO_2}$ = 2,622 mm^2
k_{O2} = 0,780 mm^2	k_{O2} = 1,423 mm^2

H' (mm)	H (mm)
10′ — 5	— 2,5
20′ — 10	— 4
30′ — 15,5	— 6,5
40′ — 20,5	— 9
50′ — 25,5	— 10,5
60′ — 31,5	— 13

$$x_{O2} = H' \cdot 2{,}84 - H \cdot 3{,}76;\ x_{CO2} = -H' \cdot 5{,}24 + H \cdot 9{,}56$$
$$x_{O2} = -40{,}6\ \text{mm}^3;\ x_{CO2} = +40{,}7\ \text{mm}^3$$
$$Q_{O2} = -4{,}4;\ Q_M^{O_2} = 0.$$

b) *Anaerob*: 5% CO_2-Argon

$$V = 23{,}34\ \text{cm}^3;\ V_F = 7{,}35\ \text{cm}^3;\ k_{CO2} = 1{,}822;\ k^R_{CO_2} = 2{,}622$$

h (mm)
5′ + 3,5
10′ + 6,5
15′ + 9,5
20′ + 13,5

$$x_{CO2} = +34{,}1\ \text{mm}^3;\ Q_M^{Argon} = +11.$$

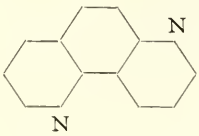
Literatur

1 Warburg, O., Metabolism of Tumors, London Constable 1930.
2 Fujita, A., Klin. Wschr. 7 (1928), 897.
3 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exp. Med. 99 (1954), 167.
4 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 515.
5 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. Naturforschg. 12b (1957), 115; 15b (1960), 378.
6 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. Naturforschg. 13b (1958), 588.

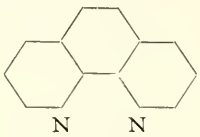
75 Ortho- und meta-Phenanthrolin in Chlorella*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Da die Hemmung der Photosynthese durch Phenanthrolin, die 1944 entdeckt wurde[1], heute bei der Untersuchung der Photosynthese eine wesentliche Rolle spielt, so schien uns eine entsprechende Entscheidung erwünscht, ob diese Hemmung eine narkotische oder eine spezifisch chemische ist; ob sie auf einer Verdrängung von Oberflächen[2] oder auf einer Komplexbildung mit Schwermetall beruht. Wir haben zu dem Zweck die Wirkung von ortho- und meta-Phenanthrolin verglichen, von denen nur die Ortho-Verbindung Schwermetalle binden kann. Das Ergebnis war, daß ortho-Phenanthrolin etwa 100mal wirksamer ist als meta-Phenanthrolin; während beide Phenanthroline ungefähr gleich stark von Kohle adsor biert werden, also etwa gleichstarke Narkotika sind. Ortho-Phenanthrolin hemmt also die Photosynthese (und die O_2-Entwicklung in den belichteten grünen Grana) nicht durch Narkose, sondern durch Komplexbildung mit Schwermetall.



meta



ortho

Messung der Adsorption der beiden Phenanthroline

Je 2 mg Tierkohle (Merck) wurde mit Wasser gewaschen und dann mit 10 ccm m/50 Phosphat pH 6,5 übergossen, das in bezug auf orto- oder meta-Phenanthrolin 10^{-3} normal war. Dann wurde 5′ geschüttelt, zentrifugiert und in der auf das 100fach verdünnten überstehenden Lösung die Lichtabsorption bei 265 gemessen. Durch Vergleich mit der Lichtabsorption *vor* dem Schütteln mit Kohle wurde so die von der Kohle absorbierte Menge an Phenanthrolin sowie die dabei in der Lösung herrschende Konzentration des Phenanthrolins erhalten.

Wir fanden:

	Mole / Liter	Mole adsorbiert / mg Kohle
ortho	$0{,}55 \times 10^{-3}$	2,23
meta	$0{,}52 \times 10^{-3}$	2,42

also die gleiche Größenordnung an Adsorption für die beiden Phenanthroline.

Messung der Wirkung der beiden Phenanthroline

Bei der Messung der Phenanthrolinwirkung in Chlorella ist auf pH der Außenlösung zu achten. Da Chlorella nur für die freie Base, nicht für die Salze der

* Erscheint nicht an anderer Stelle.

Phenanthroline frei permeabel ist, so ist die Hemmung bei pH 6 der Außenlösung stärker als bei pH 4. Andererseits ist die Komplexbildung mit Eisen in saurer Lösung stärker als in neutraler Lösung, und so ist es möglich, daß — wenn ein Austausch der H-Ionen stattfindet — ein pH-Wert der Außenlösung existiert, bei dem die Wirkungsstärke ein Maximum hat. — Ortho-Phenanthrolin wurde als Chlorhydrat (Merck) gelöst, meta-Phenanthrolin wurde als freie Base (Schmelzpunkt 78°) eingewogen und in der äquivalenten Menge Salzsäure gelöst. — Die Suspensionsflüssigkeit für Chlorella war m/50 Kaliumphosphat unter Zusatz von so viel Bikarbonat, daß bei Sättigung mit 20 Vol.-% CO_2 pH der Phosphatlösung nicht verschoben wurde.

Bei den manometrischen Versuchen enthielt der Hauptraum eines Manometriegefäßes 100 cmm Chlorella (A-Zellen) = etwa 1,5 Chlorophyll, suspendiert in 3 ccm der genannten Salzlösung; die Birne enthielt das salzsaure Phenanthrolin, der Gasraum 20 Vol.-% CO_2-Luft, die Temperatur des Thermostaten war 20°, belichtet wurde mit weißem Licht der Intensität 800 cmm Quanten pro Minute. Die Adsorption des Phenanthrolins durch die Zellen war so gering, daß sie, bis zu 10^{-4} n Phenanthrolin, die zugesetzten Phenanthrolinkonzentrationen nicht wesentlich verminderte.

Zunächst wurde ohne Phenanthrolin belichtet, bis nach 20 Minuten die Geschwindigkeit der Druckzunahme konstant geworden und gleich v_0 geworden war. Dann wurde das Phenantrolin aus der Birne in den Hauptraum gegeben und in entsprechender Weise die gehemmte Geschwindigkeit v erhalten. Die prozentische Hemmung der Photosynthese betrug dann $(1 - \frac{v}{v_0}) \times 100$.

Bei Versuchen mit ortho-Phenanthrolin fanden wir:

pH	3,8	4,5	6,5	7,5
Ortho-Konzentration, die 70% hemmte	10^{-3}n	$0{,}33 \times 10^{-3}$n	10^{-4}n	2×10^{-4}n.

Bei Versuchen mit meta-Phenanthrolin fanden wir bei pH 6,5, bei dem die Ortho-Verbindung am stärksten hemmt, etwa 70% Hemmung durch eine 10^{-2} normale Lösung, das heißt, zur Erzielung einer Hemmung von 70% war von der Meta-Verbindung die hundertfache Konzentration notwendig.

Literatur

1 Warburg, O., und Lüttgens, W., Die Naturwissenschaften 32 (1944), 161, 301.
2 Warburg, O., Bioch. Z. 119 (1921), 134.

76 Weitere Versuche über die Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel*

Von Otto Warburg, Karlfried Gawehn und Tullio Terranova

Züchtet man embryonale Hühnerzellen nach Dulbecco-Vogt in vitro in Hankslösung + Lactalbumin + Hefeextrakt unter Zusatz von Kälberserum, so schlägt der rein aerobe Stoffwechsel der embryonalen Zellen[1] im Verlauf von 1 bis 2 Zellteilungen in den Gärungsstoffwechsel der Tumoren um, jedoch nur in denjenigen Zellen, die anwachsen. Verhindert man das Anwachsen durch langsame Bewegung der Kulturgefäße, so behalten alle Zellen den rein aeroben Stoffwechsel der embryonalen Zellen bei, den sie im Körper, in den Embryonen gehabt haben, bis sie sich in den Kulturgefäßen auflösen. Wachstum ist also eine notwendige Bedingung des Stoffwechselumschlags in vitro.

Wir haben nunmehr gefunden, daß man die Entstehung des Krebsstoffwechsels verhindern kann, wenn man, *ohne das Wachstum wesentlich zu verlangsamen*, das zur Kultur verwendete Kälberserum vorher mit 1/15 seines Volumens an Aluminiumhydroxyd 2 Stunden bewegt. Zum Beispiel wurden, bei nur wenig verschiedenem Wachstum, die folgenden Stoffwechselwerte erhalten:

	Serum nicht mit $Al(OH)_3$ vorbehandelt			Serum mit $Al(OH)_3$ vorbehandelt		
	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	Q_M^{Argon}
	—5,9	+19,3	+30,6	— 8,2	+3,4	+28,0
	—8,7	+12,0	+34,2	—13,2	+1,0	+28,4
	—8,4	+16,5	+34,0	—10,2	+3,1	+26,0
	—6,5	+15,0	+27,8	— 7,2	+4,4	+24,6
	—4,0	+16,1	+45	—11,5	+1,0	+34,6
	—6,7	+26,6	+39	— 8,2	+6,5	+28,4
Mittel	—6,7	+17,6	+35,0	— 9,8	+3,2	+28,4

Aus diesen Versuchen ist zu schließen, daß Kälberserum eine Substanz enthält, die den Umschlag des embryonalen Stoffwechsels in den Krebsstoffwechsel verursacht und die die Eigenschaft hat, daß sie von Aluminiumhydroxyd absorbiert wird. Das Problem der Entstehung des Krebsstoffwechsels aus dem embryonalen Stoffwechsel ist hiermit ein Problem der präparativen Chemie geworden.**

Der Test auf die Wirksubstanz des Kälberserums ist die manometrische Stoffwechselmessung *vor* und *nach* der 2tägigen in vitro-Kultur embryonaler Hühnerzellen. Wie man aus den Mittelwerten der Tabelle sieht, wird das Verhältnis aerobe Gärung: Atmung von 2,6 auf 0,33 erniedrigt, wenn bei der Kultur die Wirksubstanz fehlt. Qualitativ wird der Effekt der Wirksubstanz bei der Manometrie dadurch erkennbar, daß die Druckänderungen in den beiden Gefäßen unseres Gefäßpaares von positiven Drucken in negative Werte umschlagen[2].

---

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

**) Dieses Ergebnis ist von Tullio Terranova beim Simposio Patologia in Turin am 6. Juni 1961 (im Druck Archivio Scienze Mediche 1961) vorgetragen worden.

Subkulturen und Reversibilität der Stoffwechsel-Umwandlung

Wir haben gefunden, daß Subkulturen nur dann gut wachsen, wenn das Kulturmedium aufgelöste embryonale Zellen enthält. Bei der ersten Kultur ist diese Bedingung immer erfüllt, da sich bei Zugabe der *frischen* embryonalen Zellen zu dem Kulturmedium immer Zellen auflösen. Bei der Anlegung der Subkulturen wäre jedoch die Bedingung nicht erfüllt, da ja bereits umgewandelte embryonale Zellen weiter gezüchtet werden sollen. Wir haben hier den Ausweg beschritten, daß wir das Medium für die Subkulturen zunächst mit *frischen* embryonalen Hühnerzellen (200 cmm Zellen : 75 ccm Kulturmedium) 24 Stunden bei 38° unter Sättigung mit 5 Vol.-% CO_2-Luft langsam schütteln, wobei die Zellen nicht anwachsen, aber sich zu einem großen Teil auflösen. Zentrifugiert man dann die nicht aufgelösten Zellen ab, so ist der Überstand unser „Medium für Subkulturen", in dem wir bis zur 15. Subkultur gezüchtet haben, und das sich wahrscheinlich zur unbegrenzten Überimpfung eignet. Mit Hilfe der Subkulturen haben wir gefunden, daß der Krebsstoffwechsel erhalten bleibt, wenn mit Kälberserum gezüchtet wird, daß aber der Krebsstoffwechsel sich wieder in den embryonalen Stoffwechsel zurückverwandelt, wenn man die Subkulturen ohne Kälberserum ansetzt. Der Umschlag in den Krebsstoffwechsel ist also reversibel.

Mit Hilfe der Subkulturen haben wir ferner festgestellt, daß der relativ hohe Katalasegehalt der embryonalen Zellen, der bei der ersten Kultur hoch bleibt, auch im Laufe der Subkulturen nicht absinkt, so daß also der Umschlag des embryonalen Stoffwechsels in den Gärungsstoffwechsel hier *nicht* verbunden ist mit einem Abfall der Katalase auf die Werte von Krebszellen. Trotz Gärungsstoffwechsel fanden wir im Katalase-Test, daß 1 mgr Zell-Trockengewicht bei 38° aus n/320 H_2O_2 (in Ringer-CO_2 pH 7,4) 10 cmm O_2 pro Minute entwickelte, während der entsprechende Wert für Ascites-Krebszellen etwa 0,5 cmm O_2 pro Minute beträgt.

Tumoren

Impft man 400 cmm embryonale Hühnerzellen, die nach DULBECCO-VOGT aus 10tägigen Hühnerembryonen gewonnen sind, 3 bis 5 Tage alten Hühner-Küken unter die Rückenhaut, so entstehen bald kleine Knoten, die nach 10 Tagen beginnen, wieder zurückzugehen und immer vollständig verschwinden. Wiederholt man jedoch die Impfung 10mal im Abstand von 4 Tagen mit den gleichen großen Zellmengen, so entstehen Tumoren, die nicht zurückgehen, sondern mit den Hühnern weiter wachsen und in 5 Monaten Gewichte bis zu 250 g erreichen. Da es den Tieren dann schlecht ging, wurden sie getötet; weder ein Zurückgehen der Tumoren, noch Metastasierung wurden beobachtet. Professor W. Masshoff, der Pathologe der Freien Universität Berlin, hat auf unsere Bitten diese Tumore untersucht und sie als „zystenreiche Teratome" diagnostiziert.

Literatur

1 Wie andere, so glauben auch C. J. HOMBURG-Amsterdam unsere Entdeckung bestätigt zu haben, daß Körperzellen bei der Kultur in vitro mit Krebsstoffwechsel wachsen, unabhängig davon, ob die Zellen bei der Implantation in den Körper aufgelöst werden oder als Krebszellen wachsen. Vorgetragen in der Form emotioneller Polemik, wie man es bei Krebsforschern häufig findet, leidet diese Arbeit unter dem Umstand, daß ihre Methoden der Stoffwechselmessung (Stoffwechselmessung in Salzlösungen, teils beim Kohlensäuredruck Null) bereits 1925 obsolet gewesen wären. (HOMBURG, C. J., und Mitarbeiter, Cancer Research 21 (1961), 353.)

2 WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A.-W., und LORENZ, O., Z. physiol. Chem. 321 (1960), 246.

77 Weiterentwicklung der manometrischen Methoden*

(Wechsel aerober und anaerober Bedingungen)

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Mit Hilfe der Wannengefäße können in den Manometriegefäßen, ohne sie zu öffnen, Sauerstoffdrucke in wenigen Minuten erzeugt oder fortgenommen werden, so daß es nunmehr möglich ist, den Stoffwechsel in den Übergangszeiten aerob ⇄ anaerob zu messen

Während bisher der Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen und umgekehrt durch Gasdurchleitung vorgenommen wurde — wobei jeder Wechsel einschließlich der Ausgleichszeit 20 Min. in Anspruch nahm —, können wir nunmehr mit Hilfe der Wannengefäße[1] durch Entwicklung oder Absorption von O_2 in den Manometriegefäßen den Wechsel innerhalb weniger Min. vornehmen und dank

Abb. 1. Manometriegefäß mit Wanne und 2 Birnen. Vol. ca. 20 cm^3.

dieser Verbesserung die Stoffwechselvorgänge in den Übergangszeiten untersuchen. Es werden dabei zu einer gegebenen Zeit t aus der mit Wanne verbundenen Birne Substanzen in die Wanne gegeben, die hier in saurer Lösung O_2 entwickeln oder absorbieren und somit, was Vorbedingung der Methode ist, den Kohlensäuredruck nicht ändern. Die folgenden Substanzen sind für diese Zwecke geeignet:

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960) : 786

1. In der Wanne H_2O_2, in der Birne $KMnO_4$

In die Wanne geben wir z. B. 10 μMole H_2O_2, gelöst in 0,3 cm³ 1-*n*. H_2SO_4; in die mit der Wanne verbundene Birne 0,1 cm³ *n*/1-$KMnO_4$. Gibt man das $KMnO_4$ in die Wanne, so werden in wenigen Min. 224 mm³ O_2 (= x_{O_2}) entwickelt. Dann ist der O_2-Druck h_{O_2}, der in den Manometriegefäßen erzeugt wird, wenn die Gefäßkonstante für O_2 gleich 1,5 ist,

$$h_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}} = \frac{224}{1{,}5} = 149 \text{ mm Brodie.}$$

Der O_2-Druck h_{O_2}, bei dem die volle Atmung von Zellsuspensionen erreicht ist, hängt von der Größe [2] der Zellen ab, er beträgt selten mehr als 20 bis 50 mm Brodie, so daß ein O_2-Druck von 150 mm Brodie mehr als ausreichend zur Herstellung aerober Bedingungen ist.

Eine spontane O_2-Entwicklung aus überschüssiger Übermangansäure in der Wanne haben wir unter unseren Versuchsbedingungen nicht beobachtet.

2. In der Wanne H_2O_2, in der Birne Katalase

Eine Alternative zu 1. ist H_2O_2 in der Wanne, Katalase in der Birne, wobei z. B. 20 μMole H_2O_2 in 0,3 cm³ *m*/10-Phosphat pH 5 in der Wanne gelöst sind und die Birne 10 μg Katalase-Böhringer in 0,1 cm³ Wasser enthält. Dann werden bei Zugabe der Katalase 10 μMole = 224 mm³ O_2 entwickelt.

3. In der Wanne Wasser, in der Birne Chromchlorür

Die Anwendung der Chromosalze in der Manometrie, die wir zuerst 1931 vorgeschlagen haben[3], hatte damals viele Nachteile. Die verwendeten Lösungen wurden bereits beim Einfüllen durch den Luft-O_2 oxydiert, es destillierte Essigsäure in den Hauptraum, es entwickelte sich Wasserstoff nach der Gleichung $Cr^{2\oplus} + H^{\oplus} = Cr^{3\oplus} + H$ und vor allem, man sparte nicht die Gasdurchleitung und konnte nicht den Stoffwechsel in der Übergangszeit messen.

Alle diese Nachteile werden vermieden, wenn man festes trockenes Chromchlorür, das Riedel de Haen in den Handel bringt, in die Birne einwägt und es erst zur gegebenen Zeit *t* in der Wanne, die Wasser enthält, auflöst. Wir schützen das Chromchlorür in der Birne vor Wasserdämpfen durch Mischen mit wasserfreiem Calciumchlorid und erreichen so, daß das Chromchlorür in der Birne vor dem Einkippen in die Wanne nur wenig O_2 absorbiert. Beim Einkippen in die Wanne aber löst sich das Chromchlorür schnell auf und absorbiert dann den O_2 aus dem Gasraum in wenigen Minuten. Eine Wasserstoffentwicklung aus der schwachsauren Lösung in der Wanne haben wir in mehreren Stunden bei 20° nicht beobachtet.

Die Mengenverhältnisse bei unseren Versuchen waren: 12 mg $CrCl_2$ + 20 mg $CaCl_2$ in der Birne, 0,4 cm³ Wasser (ohne Säurezusatz) in der Wanne. Da das Mol.-Gew. des $CrCl_2$ 122 ist, können 12 mg $CrCl_2$ 100/4 = 25 μMole = 560 mm³

O_2 absorbieren. Höhere O_2-Drucke als 200 mm Brodie wird man im allgemeinen bei derartigen Versuchen nicht zu entfernen haben, da bei 200 mm Brodie die maximale Atmung von Zellsuspensionen immer erreicht sein wird.

Beim Einkippen des Chromchlorürs und Calciumchlorids in die Wanne entsteht ein „Einkippdruck" von etwa 15 mm Brodie, wenn der Gasraum 20 Vol.-% Kohlensäure enthält. Dieser Einkippdruck muß berücksichtigt werden, wenn der O_2-Druck vor der Entfernung des O_2 gemessen werden soll (was meistens überflüssig sein wird).

Will man einen O_2-Druck zur Zeit t_1 erzeugen und den O_2 zur Zeit t_2 wieder fortnehmen, so gibt man zu den Zellen im Hauptraum Katalase, in die mit dem Hauptraum verbundene Birne Wasserstoffperoxyd und erzeugt zur Zeit t_1 den O_2-Druck durch Einkippen des H_2O_2 in den Hauptraum, wobei die Zellen durch die Katalase vor der Giftwirkung des H_2O_2 geschützt sind. Soll dann zur Zeit t der O_2 wieder entfernt werden, so geschieht dies, wie oben beschrieben, mit Chromchlorür, das zu Beginn des Versuchs in die mit der Wanne verbundene Birne eingewogen worden ist.

Wir heben hier nochmals hervor, daß bei stärkerer Belichtung der Wannengefäße Thermoeffekte auftreten, wenn die Wannen Lösungen enthalten, die das Licht stark absorbieren, wie z. B. $KMnO_4$, da die Wannen durch die sie umgebende Luftschicht thermisch isolierter sind als die andern Glasteile der Gefäße. In solchen Fällen entwickeln wir den O_2 aus H_2O_2 nicht mit Permanganat, sondern mit Katalase. — Entfernen wir den O_2 mit Chromchlorür, so kippen wir bei Lichtversuchen nach der Absorption des O_2 das Chromsalz aus der Wanne in die Birne, wo es von dem Lichtstrahl nicht getroffen wird und außerdem in besserem Wärmeaustausch mit dem Thermostatenwasser steht.

Ähnlichen Schwierigkeiten sind wir begegnet, wenn wir Blätter, die in den „Vasen" standen, belichteten[4], da dabei der Wärmeaustausch der Blätter so schlecht ist, daß sie von dem Licht erhitzt werden. Wir sind deshalb damit beschäftigt, die Methode der Ausbeutebestimmung für Blätter abzuändern. Soviel sich bisher übersehen läßt, ist die Quanten-Ausbeute der Blätter sehr viel niedriger als die der *Chlorella* (ca. 15 Quanten pro Molekül O_2).

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 14b (1959), 561.
2 Warburg, O., und Kubowitz, F., Biochem. Z. 214 (1929), 5.
3 Warburg, O., Kubowitz, F., und Christian, W., Biochem. Z. 242 (1931), 170, besonders S. 175.
4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 15b (1960), 364.

78 Über den Photolyten der Photosynthese*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Unter aeroben Bedingungen, bei CO_2-Drucken von etwa 20 % einer Atmosphäre, häuft sich in *Chlorella* im Dunkeln, mit Hilfe der Energie der Atmung, der Photolyt der Photosynthese an, in Konzentrationen, die von der Größenordnung des Chlorophyllgehalts sind. Der Photolyt ist ein Derivat der Kohlensäure. Der erste Schritt bei der Entstehung des Photolyten ist die Phosphorylierung der Kohlensäure durch die Atmung.

In dieser Arbeit[1] wird zunächst gezeigt, daß lebende *Chlorella* unter aeroben Bedingungen CO_2 im Dunkeln chemisch bindet und daß die entstehende CO_2-Verbindung beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen wieder zerfällt. Die Menge CO_2, die von einer gegebenen Menge *Chlorella* mit Hilfe der Atmung gebunden werden kann, hängt von der Größe der Atmung und dem Druck der CO_2 ab, und ist eine stationäre Konzentration, bestimmt durch die Differenz von Bildung und Zerfall. Unter unsern Versuchsbedingungen war die Halbwertszeit der Bildung 5 Minuten, die Halbwertszeit des Zerfalls 35 Minuten.

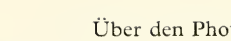
Belichtet man, so wird die aerobe CO_2 verbraucht und O_2 entwickelt. Im Licht kommt also zu dem spontanen Dunkelzerfall ein Hellverbrauch hinzu und die stationäre Konzentration der aeroben CO_2 sinkt — um so mehr, je höher die angewandte Lichtintensität ist. Quantenintensitäten von 180 mm^3 Quanten pro Minute genügen, um die stationäre Konzentration der aeroben CO_2 auf $^1/_5$ bis $^1/_{10}$ des Dunkelwerts zu erniedrigen.

Geht man von aeroben zu anaeroben Bedingungen über, wartet, bis die aerobe CO_2-Verbindung zerfallen ist und belichtet dann, so findet man zunächst keine Lichtwirkung. Belichtet man aber anaerob fortgesetzt, so genügt ein kleiner Rest an aerober CO_2, daß sich autokatalytisch O_2 entwickelt und daß die Atmung autokatalytisch CO_2 bindet. Erst wenn durch Bindung der CO_2 der aerobe Zustand wiederhergestellt ist, wird im Licht ebensoviel O_2 entwickelt, wie in einer von Anfang an aeroben Kontrolle. Ein Versuch ist in Abb. 1 graphisch dargestellt, bei dem die beobachteten Druckänderungen direkt als Funktion der Belichtungszeit aufgetragen sind. Der Versuch zeigt, daß bei Belichtung unter anaeroben Bedingungen die Druckänderungen zunächst Null sind; daß dann eine Periode negativer Druckänderungen folgt, die Periode, in der die aerobe CO_2 gebunden wird; und daß *erst dann* die positiven Druckänderungen der Photosynthese folgen — eine vollständige Erklärung der photochemischen Induktion bei Belichtung anaerober *Chlorella*[2].

Ersetzt man in der Suspensionsflüssigkeit der *Chlorella* das Phosphat durch Arsensäure, so wird die aerobe Bindung der Kohlensäure gehemmt. Gibt man dann (ohne die Arsensäure zu entfernen) Phosphorsäure zu der Suspensionsflüssigkeit, so steigt die aerobe CO_2 wieder auf ihren Normalwert. Es geht daraus hervor,

* Aus Zeitschrift für Naturforschung 15b (1960) : 788

daß die Phosphorsäure an der Bindung der Kohlensäure beteiligt ist, etwa gemäß der Gleichung:



$$ATP + H_2CO_3 \rightleftarrows ADP + H_2PO_3HCO_3$$

wobei das ATP durch die Atmung geliefert wird. Die Gleichung erklärt die Notwendigkeit der Atmung für die Bindung der Kohlensäure. Die Gleichung erklärt ferner die Abhängigkeit der Kohlensäurebindung vom Druck der Kohlensäure

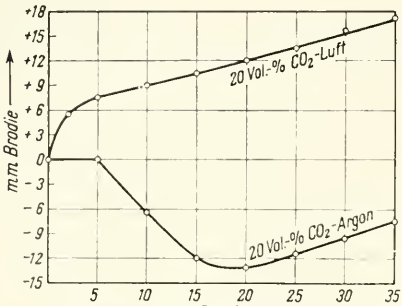
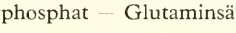


Abb. 1. Je 100 mm³ *Chlorella* = 1,24 μMole Chlorophyll, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S vom pH-Wert 3,8, wurden in den Hauptraum von 2 Kegelgefäßen gegeben. Im Gasraum befanden sich entweder 20 Vol.-% CO_2-Luft (obere Kurve) oder 20 Vol.-% CO_2-Argon (untere Kurve). Beide Gefäße wurden zunächst 30 Min. bei 20° dunkel geschüttelt. Dann wurde ab t_0 mit J_{rot} = 60 mm³ Quanten pro Minute belichtet. Die Ordinaten sind die direkt beobachteten Druckänderungen. Die aerobe CO_2 wurde mit $n/80$-Fluorid in einem Parallelversuch bestimmt. Es wurde gefunden:

Für die Bedingungen der oberen Kurve bei t_0 29,4 mm³, bei t = 35 Min. 28,6 mm³.
Für die Bedingungen der unteren Kurve bei t_0 0 mm³. bei t = 35 Min. 28,2 mm³,
Im Versuch der unteren Kurve stieg also die aerobe CO_2 von Null auf den aeroben Endwert.

sowie den anaeroben Zerfall der gebundenen Kohlensäure. Denn da es anaerob keine Neubildung von ATP gibt, tritt anaerob der spontane Zerfall des Carboxyphosphats in Erscheinung. Das erste Carboxyphosphat, das wir entdeckt haben[3] — die phosphorylierte Phosphorglycerinsäure — zerfällt spontan mit einer ähnlichen Halbwertszeit wie die aerobe CO_2-Verbindung der *Chlorella*. —*

Chlorella kann im allgemeinen aerob, bei dem Sättigungsdruck der CO_2, so viel CO_2 chemisch binden, als sie Glutaminsäure enthält. *Chlorella* kann *weniger* CO_2 aerob binden, als sie Glutaminsäure enthält, z. B. bei niedrigeren CO_2-Drucken oder wenn man aerob mit $n/800$-Fluorid ansäuert, wodurch mehr aerobe CO_2 als Glutaminsäure gespalten wird. Zersetzt man die Glutaminsäure anaerob mit $n/800$-Fluorid, so verschwindet mit der Glutaminsäure auch die aerobe Kohlensäure. Wäscht man das Fluorid fort und schüttelt die Zellen mit 20 Vol.-% CO_2-Luft, so steigt mit der Glutaminsäure die aerobe Kohlensäure. Wir schließen daraus, daß das Carboxyphosphat mit der Glutaminsäure reagiert, etwa im Sinn der Gleichung



Carboxyphosphat + Glutaminsäure ⇄ Carboxyglutaminsäure + Phoshat,

eine Gleichung, die erklärt, warum die Glutaminsäure für die Photosynthese notwendig ist[4], obwohl doch, wie wir bereits 1957 gefunden haben, Glutaminsäure bei Abwesenheit von CO_2 im Licht nicht reagiert[5]. Die Funktion der Glutaminsäure bei der Photosynthese ist also die Bindung der funktionellen CO_2, wobei allerdings die sehr schnelle Carboxylierung und Dexarboxylierung der Glutamin-

* *Zusatz August 1961.* Diese Analogie soll nur darauf hinweisen, daß die aerobe CO_2 eine ähnliche Zerfallskonstante hat, wie ein Anhydrid der Kohlensäure.

säure in *Chlorella* — die einen physiologischen Sinn haben muß — unklar bleibt.

Carboxyglutaminsäure ist noch nicht der Photolyt der Photosynthese, vielmehr ist auf dem Weg zum Photolyten noch eine weitere Dunkelreaktion notwendig, die wie die erste Dunkelreaktion der Atmung bedarf und deshalb möglicherweise eine nochmalige Phosphorylierung ist. Der Nachweis dieser Dunkelreaktion wurde durch eine glatte zeitliche Trennung von der ersten Dunkelreaktion ermöglicht.

Mißt man neben der aeroben CO_2 und der Glutaminsäure auch das Chlorophyll und die O_2-Kapazität, so findet man häufig, daß die aerobe CO_2 = der Glutaminsäure = der O_2-Kapazität = dem Chlorophyll ist. Wie unsere Tabellen zeigen, haben wir in diesem Sommer, in 3 Monaten, fast ausnahmslos die Gleichheit der 4 Größen gefunden.

Andererseits haben wir früher mitgeteilt, daß bei gleicher normaler Zucht der *Chlorella* für Glutaminsäure: Chlorophyll und aerobe CO_2 : Chlorophyll Verhältnisse von 1 bis 1,7 gefunden wurden. In den bei extrem hohen Lichtstärken gezüchteten x-Zellen, die einen sehr niedrigen Chlorophyllgehalt haben und extrem schlechte Quantenausbeuten geben, haben wir für Glutaminsäure : Chlorophyll und aerobe CO_2 : Chlorophyll sogar Werte bis zu 5 gefunden.

Die nähere Untersuchung der x-Zellen hat in der letzten Zeit ergeben, daß die O_2-Kapazität, d. h. die Menge an Photolyt, die in *Chlorella* angehäuft werden kann, nahezu gleich ist dem Chlorophyllgehalt und nicht dem Gehalt an aerober CO_2 oder Glutaminsäure. Folgender Zusammenhang der 4 Größen wird hierdurch nahegelegt. Die CO_2 reagiert im Dunkeln reversibel mit Phosphorsäure, das entstehende Carboxyphosphat reagiert im Dunkeln reversibel mit Glutaminsäure, die Glutaminsäureverbindungen reagieren im Dunkeln reversibel mit Chlorophyll. *Was im Licht reagiert*, sind nicht die freien Komponenten, sondern nur die mit dem Chlorophyll verbundenen Komponenten. Wie die Sättigungskurven für CO_2 in verschieden gezüchteter *Chlorella* verschieden gefunden worden sind, so sind wahrscheinlich auch die Sättigungskurven für Carboxyphosphat/Glutaminsäure und Glutaminsäure/Chlorophyll je nach der Zucht verschieden. Wenn man also in den A-Zellen — die die besten Quantenausbeuten geben — häufig die Verhältnisse 1 : 1 : 1 : 1 findet, so bedeutet dies, daß in diesen Zellen die Bindungen fester sind als z. B. in den x-Zellen, die die schlechtesten Quanten-Ausbeuten geben und am meisten freie Carboxyglutaminsäure enthalten.

Wenn wir nun auf Grund unserer Versuche annehmen, daß die aerobe CO_2 mit der Glutaminsäure und daß der funktionelle Anteil der Glutaminsäure mit dem Chlorophyll verbunden ist, so gewinnen wir damit die Möglichkeit, die Wirkung des Lichts bei der Photosynthese zu verstehen, da ja dann die CO_2 Bestandteil desjenigen Moleküls ist, das das Licht absorbiert. Daß dabei die Glutaminsäure zwischen CO_2 und Chlorophyll eingeschaltet ist, kann hier kein Einwand sein, da wir bei der photochemischen Spaltung der Kohlenoxyd-Oxygenase verlustlose Energieleitung von den Aminosäuren des Proteins zu dem Kohlenoxyd-Häm gefunden haben[7].

Zusammengefaßt ist unser Ergebnis, daß die CO_2 zunächst mit Hilfe der Atmung im Dunkeln phosphoryliert wird; daß das gebildete Carboxyphosphat die Glutaminsäure carboxyliert; daß durch eine weitere Dunkelreaktion, die der

Atmung bedarf, der Photolyt entsteht; daß daraus das Licht, vielleicht in 2 Stufen, den O_2 abspaltet und so die CO_2 reduziert. Das wesentliche Experiment, das diese Entwicklung hervorgerufen hat, war die Entdeckung, daß der Photolyt der Photosynthese in lebender *Chlorella* angehäuft werden kann, und zwar in so erheblichen Konzentrationen, daß man seine Mengen messen und die Bedingungen seiner Entstehung untersuchen kann.

1. Versuchsanordnung

Zu den meisten Versuchen wurden die in fluktuierendem Licht gezüchteten A-Zellen verwendet[5], die nach 2-tägiger Kultur 5 bis 6 Gewichtsprozente Chlorophyll enthalten. Zur Bestimmung der aeroben CO_2 dienten 3 Kegelgefäße, in deren Hauptraum man je 100 mm³ Zellen gibt, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung[5] S vom pH-Wert 3,8, und deren Birnen je 0,2 cm³ $n/5$-Fluorid enthalten. Der Gasraum enthält in Gefäß I Argon, in Gefäß II 20 Vol.-% CO_2-Argon, in Gefäß III 20 Vol.-% CO_2-Luft. Kippt man nach 30 Min. Sättigung bei 20° das Fluorid in den Hauptraum, so ergibt die CO_2-Entwicklung in Gefäß I die Glutaminsäure, die nach der Gleichung

$$\text{Glutaminsäure} = \gamma\text{-Aminobuttersäure} + CO_2$$

in *Chlorella* schnell fermentativ zerfällt, wenn durch HF angesäuert wird. Die CO_2-Entwicklung in Gefäß II ergibt Glutaminsäure + Bicarbonat. Die CO_2-Entwicklung in Gefäß III ergibt Glutaminsäure + Bicarbonat + aerob gebundene CO_2. Die aerobe CO_2 wird also erhalten durch die Subtraktion III minus II.

Zum Beispiel erhielten wir aus 100 mm³ Zellen, die 28,4 mm³ Chlorophyll enthielten (1 μMol Chlorophyll = 22,4 mm³), bei 20° die folgenden CO_2-Mengen, wenn nach Einkippen des Fluorids 15 Min. bis zum Endwert gewartet wurde:

aus Gefäß I	aus Gefäß II	aus Gefäß III
29,8 mm³ CO_2	*43,4* mm³ CO_2	*68,2* mm³ CO_2
= Glutaminsäure	= Glutaminsäure + Bicarbonat	= Glutaminsäure + Bicarbonat + aerobe CO_2

Subtrahiert man II von III, so erhält man die aerobe CO_2

$$x = 68{,}2 - 43{,}4 = 24{,}8 \text{ mm}^3.$$

Während für diese Bestimmung der aeroben CO_2 Manometriegefäße ohne Einsätze verwendet werden konnten, waren für die meisten andern Versuche die neuen Wannengefäße mit 2 Birnen erforderlich[8], in denen die Wechsel von anaeroben zu aeroben Bedingungen und umgekehrt vorgenommen werden konnten, ohne daß die Gefäße geöffnet werden. Man geht zu aeroben Bedingungen über, indem man in der Wanne Permanganat mit Wasserstoffperoyxd mischt; oder indem man Katalase mit Wasserstoffperoxyd mischt. Man geht zu anaeroben Bedingungen über, indem man in der Wanne trockenes Chromchlorür in Wasser kippt.

Unter aeroben Bedingungen verstehen wir dabei Sauerstoffdrucke, bei denen die Atmung der *Chlorella* maximal ist, z. B. 200 mm Brodie, die für diesen Zweck mehr als ausreichend ist. Anaerob waren die Bedingungen, wenn keine Atmung gemessen werden konnte, ein Zustand, der durch Chromchlorür in wenigen Minuten und viel schneller als durch gelben Phosphor hergestellt wird. Der CO_2-Druck war dabei meistens 20% einer Atmosphäre und blieb bei allen Wechseln der O_2-Drucke konstant.

Da man nach der Erzeugung der aeroben oder anaeroben Bedingungen am Manometer sieht, wie die aerobe Kohlensäure aufgenommen oder abgegeben wird, könnte man an eine direkte manometrische Messung denken. Doch würde dabei die Kohlensäurebilanz *während* der Änderung der O_2-Drucke, also in den ersten

5 Minuten des Wechsels — die am wichtigsten ist — für die Messungen verloren gehen. Man mißt deshalb alle Änderungen des CO_2-Gehalts durch Einkippen von Fluorid (0,2 cm³ n/5, pH 3,8) in den Hauptraum in 3 cm³ zu verschiedenen Zeiten und erhält so lückenlos den zeitlichen Verlauf der Bildung oder des Zerfalls der aeroben Kohlensäure.

Auch andere gasanalytische Probleme konnten mit Hilfe der Wannengefäße leicht gelöst werden. Zu entscheiden war z. B. die Frage, ob die aerobe CO_2, die Fluorid austreibt, mit O_2 verunreinigt ist, mit andern Worten, ob *Chlorella* aerob nicht nur CO_2, sondern auch O_2 bindet. Zur Prüfung wurden in den Hauptraum von 2 Wannengefäßen je 100 mm³ *Chlorella* gegeben, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S pH 3,8. Der Gasraum enthielt 20 Vol.-% CO_2 1 Vol.-% O_2 in Argon. In Gefäß I wurde der O_2 bei t_0 mit Chromchlorür fortgenommen, in Gefäß II wurde bei t_0 Fluorid zu den Zellen gegeben und erst nach beendeter CO_2-Entwicklung der O_2 mit Chromchlorür fortgenommen. Wir fanden, daß Chromchlorür aus beiden Gefäßen die gleiche O_2-Menge absorbierte. Es war damit bewiesen, daß Fluorid, unter aeroben Bedingungen, keinen O_2 aus *Chlorella* austreibt.

Die Salzlösung S, in der die Zellen bei allen Versuchen suspendiert waren, hatte die Zusammensetzung: 10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl, 0,4 g NH_4Cl + 2 l H_2O + 0,6 cm³ 1-*n*. H_2SO_4. Der pH-Wert soll 3,8 betragen. Wegen des sauren pH-Wertes enthielt die Salzlösung S auch bei Sättigung mit 20 Vol.-% CO_2 nur sehr wenig Bicarbonat.

2. Die Quotienten Glutaminsäure/Chlorophyll, Aerobe Kohlensäure/Chlorophyll, O_2-Kapazität/Chlorophyll

Eine Neubestimmung des Quotienten Glutaminsäure/Chlorophyll für *Chlorella* hat ergeben, daß der Quotient im Lauf des Sommers in allen unseren normal gezüchteten Zellen, nahe gleich 1 war. Nur die x-Zellen, die bei extrem hohen Lichtstärken und mit Überhitzung gezüchtet werden und die extrem niedrige Quantenausbeuten geben, lassen keinen Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Chlorophyll erkennen. Sie enthalten im Zellsaft gelöste Glutaminsäure.

Tab. 1 enthält eine Versuchsreihe, die im Juli dieses Jahres im wesentlichen mit A-Zellen (die das Licht am besten ausnutzen) ausgeführt worden ist.

Zellart	Glutaminsäure (mm³)	Chlorophyll (mm³)
2tägige A	28,4	27,8
2tägige A	29,8	28,4
2tägige A	24,9	27,8
2tägige A	32,0	30,4
2tägige A	32,2	33,0
2tägige S	38,5	33,4
2tägige N	30,2	34,0
2tägige A	33,8	32,5
2tägige A	30,6	33,8
Mittel	30,8	31,4

Tab. 1. Glutaminsäure und Chlorophyll in 100 mm³ *Chlorella* (22,4 mm³ = 1 μMol Glutaminsäure = 1μMol Chlorophyll).

Tab. 2 enthält eine entsprechende Versuchsreihe, bei der die aerobe CO_2 und das Chlorophyll bestimmt wurden, die aerobe CO_2 bei dem CO_2-Druck von 20% einer Atmosphäre, bei dem die Zellen mit aerober CO_2 gesättigt waren.

Tab. 3 enthält eine entsprechende Versuchsreihe, bei der die O_2-Kapazität und

Zellart	Aerobe CO_2 (mm^3)	Chlorophyll (mm^3)
2tägige A	25,0	28,4
2tägige A	26,8	27,8
2tägige A	29,0	30,4
2tägige A	26,3	32,5
2tägige A	30,0	33,8
2tägige A	32,2	29,2
2tägige A	21,7	21,4
Mittel	27,3	29,2

Tab. 2. Aerobe CO_2 (Sättigungswerte) und Chlorophyll in 100 mm^3 *Chlorella* (22,4 mm^3 = 1 μMol Chlorophyll).

das Chlorophyll bestimmt wurden. Die O_2-Kapazität[9] ist die Menge des durch Licht leicht abspaltbaren O_2, die man unter optimalen Bedingungen in *Chlorella* im Dunkeln anhäufen kann. Es sind die gleichen Bedingungen, unter denen man die aerobe CO_2 maximal anhäufen kann — ein O_2-Druck, der aerobe Bedingungen

Datum (1960)	$\mathcal{J}$ (mm^3 Quanten pro min.)	CO_2-Druck (% Atm) in Luft)	O_2-Kapazität (mm^3 O_2)	Chlorophyll (mm^3)
6. 5.	30	10	20	23,3
9. 5.	60	10	22,7	21,1
10. 5.	60	10	22,7	28,2
10. 5.	60	20	31,7	28,2
11. 5.	60	10	20,6	26
11. 7.	30	20	26	29,8

Tab. 3. O_2-Kapazität und Chlorophyll in 100 mm^3 *Chlorella* (22,4 mm^3 = 1 μMol Chlorophyll).

herstellt, ein CO_2-Druck von 10 bis 20% einer Atmosphäre und eine Vorbehandlung von 20 bis 30 Minuten im Dunkeln bei 20°. Die O_2-Kapazität nach dieser Vorbehandlung wird bestimmt, indem man mit $\mathcal{J} = 60$ (mm^3 Quanten pro Minute) 5 Minuten belichtet und von dem entwickelten O_2 $^1/_2$ der folgenden stationären O_2-Entwicklung für 5 Minuten Belichtung abzieht. Tab. 3 enthält das Ergebnis von Versuchen mit 2tägigen A-Zellen bei variierten Lichtintensitäten und CO_2-Drucken.

Das Ergebnis der 3 Tabellen zeigt, daß die Glutaminsäure, der Sättigungswert der aeroben CO_2 und die O_2-Kapazität nahe gleich dem Chlorophyllgehalt der *Chlorella* waren*, so daß die Idee naheliegt, ein über Glutaminsäure an Chlorophyll gebundenes CO_2-Derivat spalte im Licht O_2 ab.

* *Zusatz 1961.* D. Arnon zum Problem des Photolyten in Wolf Vishniac, Participation of Chlorophyll in Photosynthesis. Comparative Biochemistry of photoreactive Systems. Academic Press, New York 1960. "Having been in Warburgs laboratory as a visitor during the period when these experiments with CO_2-Chlorophyll ratios were going on, it may be incumbent upon me to make a comment on this subject. That is, as Dr. Vishniac has pointed out, Warburg has

3. Arsensäure

Als wir fanden, daß die aerobe Bindung der CO_2 in *Chlorella* der Atmung bedarf, lag es nahe, die Bindung der CO_2 als eine Phosphorylierung aufzufassen. Bei der experimentellen Prüfung dieser Idee durch Waschen der *Chlorella* mit phosphatfreien Lösungen wurde eine Hemmung der CO_2-Bindung *nicht* gefunden, doch fanden wir eine Hemmung, wenn wir die Phosphorsäure der Suspensionsflüssigkeit durch Arsensäure ersetzten. Offenbar dringt in lebende *Chlorella* soviel Arsensäure ein, daß Phosphorsäure aus der Phosphorylierungs-Reaktion verdrängt[10] und dadurch die ATP-Bildung und die Bindung der CO_2 gehemmt wird.

Zu den Versuchen wurde als Suspensionsflüssigkeit der *Chlorella* die Salzlösung „S" verwendet[5], deren pH 3,8 ist und deren *n*/50-Phosphat durch *n*/50-Arseniat ersetzt wurde. Nachdem *Chlorella* mit dieser Lösung 5mal auf die Zentrifuge gewaschen worden war, wurde sie im Thermostaten bei 20° eine halbe Stunde mit 20 Vol.-% CO_2-Luft geschüttelt. Dann wurde die aerobe Kohlensäure in der üblichen Weise mit Hilfe von Fluorid bestimmt. Zum Beispiel fanden wir für 100 mm³ Zellen:

	In *n*/50-Phosphat	In *n*/50-Arseniat	In *n*/50-Phosphat + *n*/50 Arseniat
mm³ aerobe CO_2	*29,9*	*18,6*	*31,4*
mm³ aerobe CO_2	*33,6*	*19,9*	*31,4*

Offenbar hemmt hier die Arsensäure die Bildung der aeroben CO_2 lediglich durch Verdrängung der Phosphorsäure; andernfalls könnte durch Zusatz von Phosphat zu der Arsensäure-Lösung die aerobe CO_2 nicht wieder auf den Normalwert steigen.

Sogar bei zweitägiger Kultur der *Chlorella* in einer Kulturlösung, deren *n*/50-Phosphat durch *n*/50-Arseniat ersetzt war, hemmte Arseniat im wesentlichen die Vermehrung durch Verdrängung des Phosphats, da auch hier Phosphatzusatz die Arseniathemmung zum größeren Teil zum Verschwinden brachte. Zum Beispiel fanden wir in 2 Tagen die folgenden Vermehrungen von *Chlorella*:

In Kulturlösung mit *n*/50-Phosphat	von 60 auf 572 mm³.
In Kulturlösung mit *n*/50-Arseniat	von 60 auf 89 mm³.
In Kulturlösung mit *n*/50-Arseniat + *n*/50-Phosphat	von 60 auf 446 mm³.

---

withdrawn the idea, which he originally believed in very strongly, that there is a constant ratio betwen CO_2 and chlorophyll. His withdrawal was rather unobtrusive; two short notes in Z. Naturforschung where he pointed out that what he thought was a chlorophyll-CO_2 compound turned out to be a decarboxylation of glutamic acid.

Now then next he became very excited over the idea that the carboxylation reaction might be the carboxylation of γ-aminobutyric acid. So then he tried γ-aminobutyric acid as a CO_2-acceptor und found that that did not work. So he abandoned that idea too. The third point was that he did not have a 1:1 ratio of glutamic acid to chlorophyll. Now whar is left then, after all this is said and done?"

Dies als Beispiel jener Polemik, die James Franck und Eugene Rabinowitsch während des Krieges in die Wissenschaft eingeführt haben und die offenbar Schule macht. Dies ist nicht die Sprache der Wissenschaft.

Die reversible Hemmung der aeroben Bindung der CO_2 durch Arsensäure beweist unseres Erachtens, daß die Bindung der CO_2 eine Phosphorylierung der CO_2 ist, im Sinn der in der Einleitung vorgeschlagenen Gleichung.

4. Bildungsgeschwindigkeit der aeroben CO_2

In 7 Wannengefäßen wurden je 100 mm³ Zellen zunächst 30 Minuten bei 20° mit 20 Vol.-% CO_2-Argon geschüttelt, um die anaeroben Bedingungen herzustellen. Dann wurden bei t_0 durch Entwicklung von 200 mm (Brodie) O_2-Druck in den Wannen aerobe Bedingungen hergestellt und damit die Bildung der aeroben CO_2 gestartet. Wurde dann zu den Zeiten t_0, t_1, t_2 usw. durch Einkippen von Fluorid in den Hauptraum die gesamte CO_2 entwickelt, so ergab sich die aerobe CO_2 x_t zur Zeit t

$$x_t = (\text{Fluoridwert})_t \text{ minus } (\text{Fluoridwert})_{t_0}.$$

Die folgenden Fluoridwerte wurden gefunden:

t (Min.)	0	5	10	30
(Fluoridwert)$_t$	+44,2	+58,3	+68,8	+76,5
(Fluoridwert)$_{t_0}$	—	—44,2	—44,2	—44,2
Aerobe CO_2 (mm³)	*0*	*+14,2*	*+24,6*	*+32,3*

t (Min.)	60	120	240
(Fluoridwert)t	+73,5	+68,8	+53,4
(Fluoridwert)t_0	—44,2	+44,2	—44,2
Aerobe CO_2 (mm³)	*+29,3*	*+24,6*	*+ 9,2*

Der Versuch ist in Abb. 2 graphisch dargestellt. Wie man sieht, ist 6 Minuten nach Herstellung der aeroben Bedingungen der halbe Wert, nach 30 Minuten der Sättigungswert der aeroben CO_2 erreicht. Im weiteren Verlauf des Versuches verbrauchte dann die Atmung den O_2 und die aerobe CO_2 wurde wieder abgegeben.

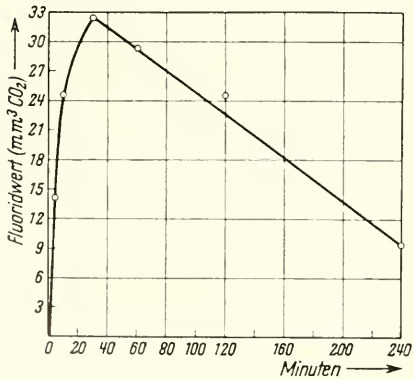


Abb. 2. Je 100 mm³ *Chlorella* = 1,3 μMole Chlorophyll in 3 cm³ Salzlösung S, pH 3,8, suspendiert, wurden in den Hauptraum von 7 Wannengefäßen gegeben. Gasraum 20 Vol.-% CO_2-Argon. Birnen zum Hauptraum 0,2 cm³ $n/5$-Fluorid, pH 3,8. Birnen zur Wanne 0,1 cm³ $n/1$-$KMnO_4$; in den Wannen 15 μMole H_2O_2, gelöst in 0,3 cm³ $n/100$-H_2SO_4. Zunächst 30 Min. bei 20° anaerob geschüttelt, dann durch Einkippen in die Wannen der aerobe Zustand hergestellt, durch O_2-Druck von etwa 200 mm Brodie. Bei t_0, t_1, t_2 usw. Fluorid in den Hauptraum. Ordinaten aerobe CO_2 zur Zeit t.
x_t = (Fluoridwert)$_t$ minus (Fluoridwert)$_{t_0}$

5. Spaltungsgeschwindigkeit der aeroben CO_2

In 7 Wannengefäßen wurden je 100 mm³ Zellen zunächst 30 Minuten bei 20° mit 20 Vol.-% CO_2, 3 Vol.-% O_2-Argon geschüttelt, um die aeroben Bedingungen herzustellen. Dann wurden bei t_0 durch Absorption des O_2 mit $CrCl_2$ anaerobe

Bedingungen hergestellt und damit der Zerfall der aeroben CO_2 gestartet. Wurde dann zu den Zeiten t_0, t_1, t_2 usw. durch Einkippen von Fluorid in den Hauptraum die gesamte CO_2 entwickelt, so war die aerobe CO_2 x_t zur Zeit t

$$x_t = (\text{Fluoridwert})_t \text{ minus } (\text{Fluoridwert})_{t=\infty}.$$

Die folgenden Fluoridwerte wurden gefunden:

t (Min.)	0	5	10	30
(Fluoridwert)$_t$	+78,8	+71,7	+74,3	+61,3
(Fluoridwert)$_{t=\infty}$	—40,6	—40,6	—40,6	—40,6
Aerobe CO_2 (mm³)	*+38,2*	*+31,1*	*+33,7*	*+20,7*

t (Min.)	60	120	240
(Fluoridwert)$_t$	+49,6	+41,2	+40,6
(Fluoridwert)$_{t=\infty}$	—40,6	—40,6	—40,6
Aerobe CO_2 (mm³)	*+ 9,0*	*+ 0,6*	*0*

Der Versuch ist in Abb. 3 graphisch dargestellt. Wie man sieht, war 35 Min. nach Herstellung der anaeroben Bedingungen die aerobe CO_2 zur Hälfte zerfallen, nach etwa 2 Stunden war der Zerfall vollständig. Vergleicht man die Abb. 2 und 3, so sieht man, daß bei einem CO_2-Druck von 20% einer Atmosphäre die aerobe CO_2 sich viel schneller bildet, als sie zerfällt, und man versteht, daß unter unsern

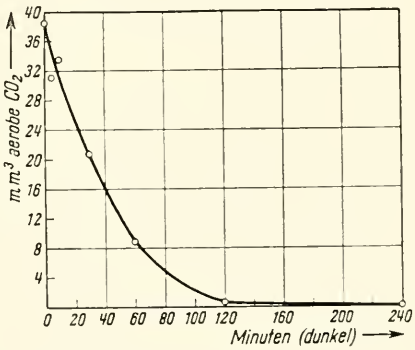


Abb. 3. Je 100 mm³ *Chlorella* = 1,47 μMole Chlorophyll, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung, pH 3,8, wurden in den Hauptraum von 7 Wannengefäßen gegeben. In den Wannen befanden sich 0,4 cm³ Wasser. Die Birnen zu den Wannen enthielten 12 mg $CrCl_2$ + 20 mg $CaCl_2$. In den Birnen zum Hauptraum waren 0,2 cm³ $n/5$-Fluorid, pH 3,8. Der Gasraum enthielt zunächst 20 Vol.-% CO_2, 3 Vol.-% O_2-Argon, womit zunächst 30 Min. bei 20° geschüttelt wurde, um die Zellen mit aerober CO_2 zu sättigen. Dann wurde bei t_0 durch Einkippen des $CrCl_2$ in die Wannen der anaerobe Zustand hergestellt und durch Einkippen von Fluorid in den Hauptraum bei t_0, t_1, t_2 usw. die gesamte CO_2 entwickelt. Ordinaten aerobe CO_2 x_t zur Zeit t.

$$x_t = (\text{Fluoridwert})_t \text{ minus } (\text{Fluoridwert})_{t=\infty}.$$

Versuchsbedingungen, bei einem CO_2-Druck von 20% einer Atmosphäre, die aerobe CO_2 sich in den Zellen anhäufen muß. Bei niedrigeren CO_2-Drucken aber ist die Bildung der aeroben CO_2 soviel langsamer, daß bei Sättigung mit 1% CO_2-Luft die aerobe CO_2 im stationären Zustand nahezu Null ist. Der O_2-Druck jedoch hat oberhalb der Sättigungskonzentration für die Atmung keinen Einfluß auf die stationäre Konzentration der aeroben Kohlensäure.

Berechnet man aus der Kurve der Abb. 3 das Verhältnis $-(dx/dt) \cdot (1/x)$, so findet man es nahezu konstant, und zwar gleich 0,02 reziproken Minuten. 2% der aeroben CO_2 zerfällt also in *Chlorella* bei 20°.

Wenn es in dem anaeroben Versuch der Abb. 3 ca. 2 Stunden dauert, bis die aerobe CO_2 zersetzt worden ist, so muß man bedenken, daß die Zellen vorher aerob bei hohem CO_2-Druck mit aerober CO_2 gesättigt worden waren. Wäscht man aber die Zellen vorher auf der Zentrifuge ohne CO_2-Druck und sättigt dann mit 20 Vol.-% CO_2-Argon, so enthalten die Zellen nach 20 Min. Ausgleich keine aerobe Kohlensäure.

6. Verbrauch der aeroben Kohlensäure im Licht

Sättigt man *Chlorella* mit aerober CO_2, belichtet dann und bestimmt im Licht die aerobe CO_2 mittels Fluorid, so findet man, daß die Konzentration der aeroben CO_2 im Licht abnimmt, um so mehr, je höher die Lichtintensität ist.

Je 100 mm³ Zellen = 1,45 μMole Chlorophyll, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S, pH 3,8, wurden zur Sättigung mit aerober CO_2 30 Minuten mit 20 Vol.-% CO_2-Luft geschüttelt. Dann wurde mit verschiedenen Intensitäten 5 Minuten belichtet und nach der Belichtung sofort aus den Birnen 0,2 cm³ n/5-Fluorid, pH 3,8, in die Zellsuspensionen eingekippt. Wurde von den so erhaltenen aeroben Fluoridwerten der für 20 Vol.-% CO_2-Argon bestimmte anaerobe Fluoridwert abgezogen, so wurde die aerobe CO_2 im stationären Dunkel- oder Hellzustand erhalten. Drücken wir die angewandten Quantenintensitäten I roten Lichts in mm³ Quanten pro Minute aus und wurde je 5 Minuten belichtet, so fanden wir die folgenden Fluoridwerte:

Werte von J	0	0	30
Gasraum	20% CO_2-Argon (dunkel)	20% CO_2-Luft (dunkel)	5 Min. hell
Gesamt CO_2 (mm³)	+48,7	+75,0	+74,5
Anaerobe CO_2 (mm³)	—48,7	—48,7	—48,7
Aerobe CO_2 (mm³)	*0*	*+26,3*	*+25,8*
% des Dunkelwerts			98

Werte von J	60	180	180
Gasraum		20% CO_2-Luft	
	5 Min. hell	5 Min. hell	5 Min. hell 30 Min. dunkel
Gesamt CO_2 (mm³)	+65,0	+53,4	+74,3
Anaerobe CO_2 (mm³)	—48,7	—48,7	—48,7
Aerobe CO_2 (mm³)	*+16,3*	*+ 4,7*	*+25,6*
% des Dunkelwerts	62	18	97

Es sank also die aerobe CO_2 durch 5 Minuten Belichtung unter aeroben Bedingungen, wenn $J = 30$ war, nur wenig, aber wenn $J = 180$ war, auf 1/5 des Dunkelwerts und stieg dann, wenn nach der Belichtung verdunkelt wurde, wieder auf den Dunkelwert an. Licht vermindert also die stationäre Konzentration der aeroben CO_2, weil im Licht zu dem Dunkelzerfall ein Hellverbrauch hinzukommt. Würde das Licht nicht die gebundene, sondern die freie CO_2 verbrauchen, so könnte die Konzentration der gebundenen CO_2 nicht abnehmen, da die freie CO_2 in großem Überschuß vorhanden ist.

Wenn in starkem Licht die Konzentration der aeroben CO_2 abnimmt, wird O_2 entwickelt, aber nur wenig CO_2 absorbiert, so daß γ etwa —0,2 wird. In schwachem Licht wird gleichfalls O_2 entwickelt, aber außerdem etwa die gleiche Menge CO_2 absorbiert, so daß γ etwa gleich —1 wird. Zum Beispiel fanden wir mit der 2-Gefäßmethode bei den Lichtintensitäten 180 und 30 mm³ Quanten pro Minute:

		$\mathcal{J}_{rot} = 180$	$\mathcal{J}_{rot} = 30$
6 Min. hell nach	30 Min. dunkel in 20 Vol.-% CO_2-Luft	x_{O_2} + 30,5 mm³	x_{O_2} + 25,5 mm³
		x_{CO_2} — 7,0 mm³	x_{CO_2} — 27,2 mm³
		CO_2-Defizit 23,5 mm³;	CO_2-Defizit Null

Verdunkelt man dann, so wird in den nächsten 30 Minuten, in der Zeit der lichtinduzierten Atmung, das CO_2-Defizit nach $\mathcal{J} = 180$ wieder ersetzt und γ ist numerisch kleiner als —1; während in der Zeit der induzierten Atmung nach $\mathcal{J} = 30$ die induzierte Atmung mit einem γ von etwa —1 abläuft. So bestätigt die 2-Gefäßmethode die Ergebnisse der Fluoridmethode: daß die aerobe CO_2 bei $\mathcal{J} = 180$ stark abnimmt, aber bei $\mathcal{J} = 30$ fast konstant bleibt.

Die Versuche mit schwacher Belichtung zeigen, daß auf die Bindung der CO_2 durch die Energie der Atmung noch eine zweite Wirkung der Atmung folgt, durch die gebundene CO_2 in den Photolyten umgewandelt wird. Denn treibt man die O_2-Kapazität mit schwachem Licht aus, so wird die aerobe CO_2 bereits während der Austreibung ersetzt, aber der Wiederaufbau der O_2-Kapazität durch die induzierte Atmung erfordert dann noch 30 Dunkelminuten. Offenbar ist die Bildung der aeroben CO_2 nur der erste Schritt zur Bildung des Photolyten.

Literatur

1 Dies ist die Fortsetzung der Arbeiten über funktionelle Kohlensäure O. Warburg und G. Krippahl, Z. Naturforschg. 11b (1956), 718; O. Warburg, H. Klotzsch und G. Krippahl, Z. Naturforschg. 12b (1957), 622; O. Warburg und G. Krippahl, Z. Naturforschg. 13b (1958), 63.

2 Ist *Chlorella* bei der Untersuchung der photochemischen Induktion in einem Carbonatgemisch suspendiert, das den CO_2-Druck konstant hält, so kann man die Aufnahme der aeroben CO_2 in der Induktionszeit nicht sehen, sondern man sieht nur die allmähliche Zunahme der positiven Drucke infolge der zunehmenden O_2-Entwicklung. Vgl. O. Warburg und G. Krippahl, Z. Naturforschg. 13b (1958), 66.

3 Negelein, E., und Brömel, H., Biochem. Z. 303 (1939), 132.

4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 13b (1958), 63.

5 Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 622.

6 Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 12b (1957), 622.

7 Warburg, O., Heavy Metals and Enzyme Action. Oxford, Clarendon Press. 1949.

8 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. Naturforschg. 14b (1959), 561, und 15b (1960), 786.

9 Warburg, O., Krippahl, G., Schröder, W., und Buchholz, W., Z. Naturforschg. 9b (1957), 769; O. Warburg und W. Schröder, Z. Naturforschg. 10b (1955), 639.

10 Warburg, O., und Christian, W., Biochem. Z. 303 (1939), 40; O. Warburg, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 55 (1951), 447.

79 Neue Methode zur Bestimmung der Kohlensäuredrucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen*

Von Otto Warburg, August-Wilhelm Geissler und Siegfried Lorenz

Da die Kohlensäuredrucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen in der zukünftigen biologischen Manometrie eine große Rolle spielen werden[1], und da es bisher keine befriedigende Methode zur Bestimmung dieser Drucke gab, haben wir eine neue Methode entwickelt, die zum mindesten für die biologischen Anwendungen hinreichend genau ist. Die Schwierigkeit bei den Bestimmungen war, daß die Einstellung des Gleichgewichts

$$\frac{KHCO_3^2}{K_2CO_3 \times CO_2} = K$$

zu lange dauert, wenn man das Ferment Cartase nicht zusetzt; während bei Zusatz von Cartase das Gleichgewicht sich so schnell einstellt, daß beim Hantieren mit den Gemischen der Bikarbonatgehalt abnimmt und damit die Zusammensetzung der Gemische sich ändert.

Unsere neue Methode wird durch die Abbildung 1 erläutert. In ein großes Manometriegefäß A wird 3-molares Bicarbonat-Carbonatgemisch und einige mg

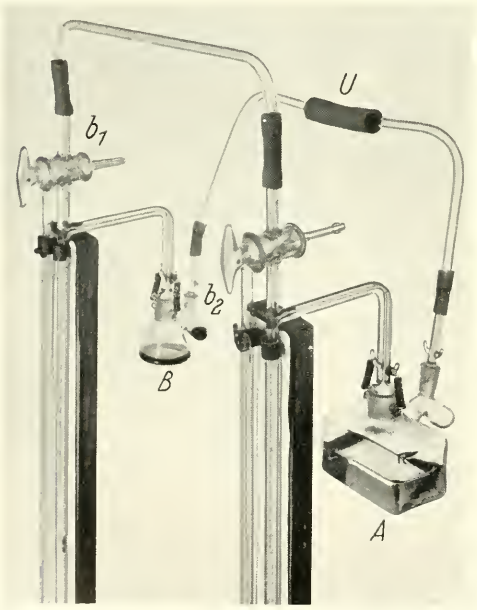


Abb. 1. A großes Manometriegefäß von etwa 80 ccm Inhalt, in das 30 ccm Bicarbonat-Carbonatgemisch + 5 mg Cartase (Schering-Berlin) eingefüllt werden. B kleines Manometriegefäß von etwa 20 ccm Inhalt, in dessen Hauptraum 105 mg $K_4Fe(CN)_6$, gelöst in 1 ccm Wasser, eingefüllt werden; und in dessen Birne 13 mg $KMnO_4$, gelöst in 0,25 ccm Wasser, eingefüllt werden, ausreichend zur Absorption von 5000 cmm CO_2. Es ist wichtig, daß sofort nach Zusatz der Cartase zu A das System nach außen abgeschlossen wird.

b_1 Hahn, b_2 Ventilstopfen. U Umwälzpumpe.

des Ferments Cartase gegeben. Das große Gefäß A ist mit einem kleinen Manometriegefäß B zu einem nach außen abgeschlossenen System, möglichst durch Glasröhren, verbunden. Beide Gefäße zusammen werden, wie bei der Manometrie,

* Erscheint nicht an anderer Stelle.

im Thermostaten lebhaft geschüttelt, während eine Umwälz-Membranpumpe U die Gasräume beider Gefäße mischt.

War die Umwälzpumpe 15 Minuten in Gang, so herrschte in dem System der Kohlensäure-Gleichgewichtsdruck des Gemischs in A. Dann wurde die Umwälzpumpe abgeschaltet, das kleine Gefäß B durch b_1 und b_2 geschlossen, und der Kohlensäuredruck in dem Gefäß B bestimmt, indem eine Lösung von $KMnO_4$ aus der Birne in eine Lösung von $K_4Fe(CN)_6$ gegossen wurde.[2] Die Sperrflüssigkeit der Manometer war Quecksilber, wenn die Kohlensäuredrucke groß waren, und Brodie'sche Lösung, wenn die Kohlensäuredrucke klein waren.

Reaktionsgleichung

Das Gleichgewicht zwischen Bicarbonat, Carbonat und CO_2 wird durch die Gleichung bestimmt:

$$\frac{KHCO_3^2}{K_2CO_3 \times CO_2} = K \qquad [1]$$

woraus man sieht, daß der Kohlensäure-Gleichgewichtsdruck von dem Verhältnis Bicarbonat/Carbonat abhängt und außerdem um so größer ist, je größer die Konzentration der Salze ist. Indem wir 3-molare Lösungen von $KHCO_3$ und K_2CO_3 mischten, konnten wir CO_2-Drucke bis zu 10% einer Atmosphäre erzeugen, die die Kohlensäuredrucke hinreichend konstant hielten.

Die Konstante K der Gleichung [1] ist dimensionslos, erhält jedoch die Dimension $\frac{\text{Mole/Liter}}{\text{mm Brodie}}$, wenn man Bicarbonat und Carbonat in Molen/Liter und CO_2 in mm Brodie ausdrückt, wie es für die Anwendung der Gleichung zur Berechnung von Kohlensäuredrucken zweckmäßig ist. — K ändert sich mit der Temperatur und mit dem Salzgehalt, da sich der Dissoziationsgrad mit dem Salzgehalt ändert. — K wäre noch besser konstant für einen gegebenen Salzgehalt, wenn man die beiden Lösungen der Gemische gleichmachen würde in bezug auf Kalium und nicht in bezug auf CO_3, doch haben wir aus anderen Gründen gleiche CO_3-Konzentration vorgezogen.

Retention der Kohlensäure

Die Retention ist definiert durch die cmm CO_2, die 1 ccm eines Gemischs absorbiert, wenn der CO_2-Druck um 1 mm Brodie steigt. Die Dimension der Retention R ist also

$$\frac{\text{cmm } CO_2}{\text{ccm Gemisch} \times \text{mm Brodie}}$$

Die Retention entscheidet darüber, in welchem Maße ein Gemisch zur Konstanthaltung des Kohlensäuredrucks brauchbar ist. Mathematisch übersieht man diesen Zusammenhang am besten, wenn man die Retention R in die manometrische k_{CO_2} Konstante einbezieht, also schreibt:

$$k^R_{CO_2} = k_{CO_2} + v_F R$$

Dann wird die Konstante zur Berechnung des O_2-Wechsels

$$K_{O_2} = k_{O_2} \times \left[\frac{k^R_{CO_2}}{k^R_{CO_2} + \gamma \times k_{O_2}} \right]$$

wo die eingeklammerte Größe der Faktor ist, mit dem k_{O_2} zu multiplizieren ist, um K_{O_2} zu erhalten. Ist zum Beispiel für ein Anhängergefäß, das 3 ccm Gemisch enthält, $k_{O_2} = 3$, $k_{CO_2} = 3{,}5$, $R = 10$ und $\gamma = -1$, so wird $K_{O_2} = k_{O_2} \times 1{,}10$ aber mit $R = 100$

$$K_{O_2} = k_{O_2} \times 1{,}03$$

Die Retention wird bestimmt, indem man in den Hauptraum der Anhängergefäße etwa 500 cmm Bicarbonat, gelöst in 3 ccm Wasser gibt, in die Birne überschüssige Schwefelsäure, während der Anhänger 3 ccm des zu prüfenden Bicarbonat-Carbonatgemischs + Cartase enthält. Gibt man dann die Schwefelsäure in den Hauptraum, so verschwindet beim Schütteln die entwickelte CO_2 bis auf einen Gleichgewichtsdruck h, aus dem sich die Retention ergibt, wenn der Druck h_0 bekannt ist, der sich für den Fall ergibt, daß der Anhänger anstatt Bicarbonat-Carbonatgemisch Wasser enthält, der Gasraum den CO_2-Druck, bei dem h bestimmt worden ist.

Cartase

Da die Wirksamkeit der Cartase für die Methode von entscheidender Bedeutung ist, haben wir die Beständigkeit der Cartase in den Bicarbonat-Carbonatgemischen untersucht. Es wurde zu dem Zweck in Manometrie-Gefäßen die Geschwindigkeit der CO_2-Absorption zu verschiedenen Zeiten nach Cartase-Zusatz bestimmt. Wir fanden bei Zusätzen von 2 mg Cartase zu 3 ccm Gemisch keine wesentliche Abnahme der Absorptionsgeschwindigkeit der CO_2 (d. h. der Cartasewirkung), wenn wir bei 38° 3 Stunden schüttelten, in einem 3-molaren Gemisch von 30 Bicarbonat und 70 Carbonat, dessen pH etwa 10,8 betrug. Die Cartase der Schering AG. erwies sich also in den 3-molaren Bicarbonat-Carbonat-Gemischen beständiger, als wir nach Angaben der Literatur erwartet hatten. Sie ist jedenfalls für unsere Zwecke hinreichend beständig, da die am meisten benutzten Gemische weniger alkalisch als pH 10,8 sind und die Versuchstemperaturen meistens niedriger als 38° sind.

Ergebnisse

Seit wir mit Hilfe neuer Manometriegefäße die Gemische, die den Kohlesäuredruck konstant halten, räumlich von den Zellen trennen, liegt kein Grund mehr vor, verdünnte Gemische anzuwenden, die bei sonst gleicher Zusammensetzung den Kohlensäuredruck schlechter konstant halten als die konzentrierten Gemische. Wir haben uns deshalb auf die Untersuchung der 2-molaren und 3-molaren Gemische beschränkt. 2-molare Gemische können von Nutzen werden, wenn man unterhalb 20° zu arbeiten wünscht. Wir teilen im folgenden unsere Ergebnisse

für die 3-molaren Gemische mit; bei 20° und darüber lassen sich mit 3-molaren Gemischen die meisten Kohlensäuredrucke herstellen und konstant halten, die für biologische Zwecke in Betracht kommen.

Molarität [Mole/l]	Gemisch $\frac{\text{ml } KHCO_3}{\text{ml } K_2CO_3}$	pH	Kohlensäure-gleichgewichtsdrucke für 20° C [mm Brodie]		Konstante K für 20° C $\left[\frac{\text{Mole/l}}{\text{mm Brodie}}\right]$	Kohlensäure-gleichgewichtsdrucke für 38° C [mm Brodie]		Konstante K für 38° C $\left[\frac{\text{Mole/l}}{\text{mm Brodie}}\right]$	Retention R $\left[\frac{mm^3}{mm \cdot cm^3}\right]$ 20° C
			gemessen:	aus $\overline{K}$ berechnet	$\overline{K} = 3{,}35 \cdot 10^{-2}$	gemessen:	aus $\overline{K}$ berechnet	$\overline{K} = 1{,}78 \cdot 10^{-2}$	
3,0	30/70	10,83	10,5	11,5	$3{,}69 \cdot 10^{-2}$	22,0	21,7	$1{,}78 \cdot 10^{-2}$	146,2
3,0	50/50	10,40	45,5	45,0	$3{,}30 \cdot 10^{-2}$	82,5	84,0	$1{,}82 \cdot 10^{-2}$	102,5
3,0	70/30	9,92	150,0	146,0	$3{,}27 \cdot 10^{-2}$	272,0	274,0	$1{,}80 \cdot 10^{-2}$	38,7
3,0	75/25	9,89	186,0	202,0	$3{,}63 \cdot 10^{-2}$	374,0	378,0	$1{,}81 \cdot 10^{-2}$	25,4
3,0	80/20	9,75	320,0	287,0	$3{,}00 \cdot 10^{-2}$	545,0	538,0	$1{,}75 \cdot 10^{-2}$	16,7
3,0	85/15	9,47	470,0	432,0	$3{,}09 \cdot 10^{-2}$	780,0	809,0	$1{,}85 \cdot 10^{-2}$	11,5
3,0	90/10	9,30	700,0	725,0	$3{,}48 \cdot 10^{-2}$	1450,0	1362,0	$1{,}68 \cdot 10^{-2}$	5,6
3,0	95/5	9,14	1240,0	1620,0	$(4{,}35 \cdot 10^{-2})$	./.	./.	./.	4,5

Tab. 3-molare Bicarbonat-Carbonat-Gemische bei 20° und 38°. Kohlensäure-Gleichgewichtsdrucke, Retentionen und pH-Werte.

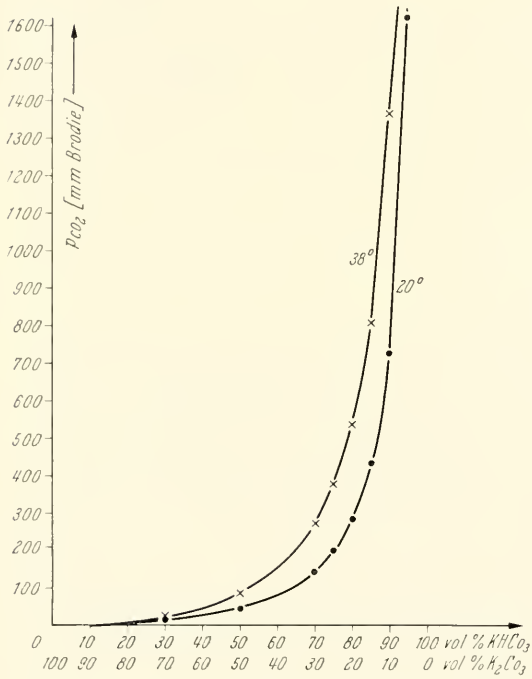


Abb. 2. CO_2-Gleichgewichtsdrucke über 3-molaren Bicarbonat-Carbonat-Gemischen bei 20° und 38°.

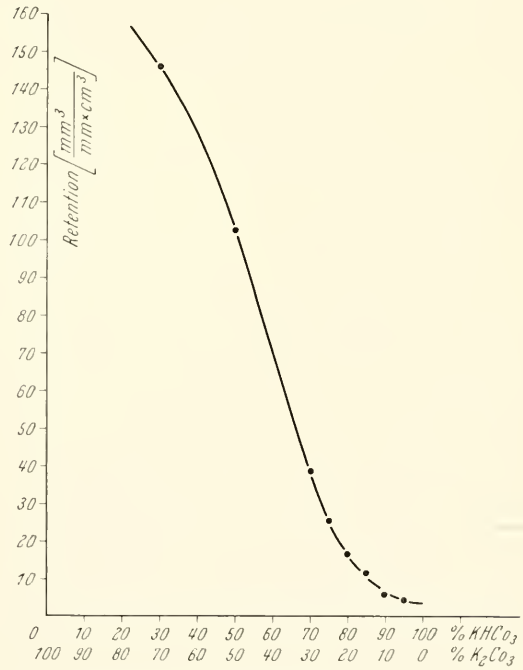


Abb. 3. Retention der Kohlensäure durch Bicarbonat-Carbonatgemische bei 20°.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 364, 370.

2 Methode bei O. Warburg und G. Krippahl, Z. f. Naturforschg. 14b (1959), 561.

80 Quantenausbeute der Photosynthese als Funktion des Kohlensäuredrucks*

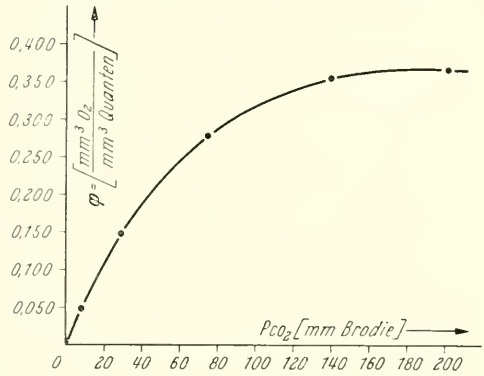
Von Otto Warburg, August-Wilhelm Geissler und Siegfried Lorenz

Da die Kohlensäuredrucke über den Bicarbonat-Carbonat-Gemischen in unserer vorjährigen Arbeit[1] über die Quantenausbeute nicht korrekt bestimmt worden waren**, mußte die Kohlensäurefunktion der Ausbeute nunmehr neu berechnet werden mit Hilfe der korrekt bestimmten[2] Kohlensäuredrucke. Die Tabelle und die Abbildung enthalten das Ergebnis.

Molarität (Mole/l)	Gemisch $\left[\frac{cm^3\ KHCO_3}{cm^3\ K_2CO_3}\right]$	P_{CO_2} mm Brodie	$\frac{1}{\varphi} = \frac{cmm\ Quant.}{cmm\ O_2}$	$\varphi = \frac{cmm\ O_2}{cmm\ Quant.}$
2	30/70	8,0	21,00	0,048
2	50/50	31,0	6,88	0,145
2	65/35	75,5	3,60	0,278
2	75/25	140,0	2,83	0,354
3	75/25	202,0	2,75	0,364

Tabelle

Kohlensäurefunktion der Quantenausbeute φ. Die Konstante $\overline{K} = \frac{KHCO_3^2}{K_2CO_3 \times CO_2}$ für die 2-molaren Salze wurde bei $20^0 = 3{,}21 \times 10^{-2} \frac{Mole}{Liter \cdot mm\ Brodie}$ gefunden.



Quantenausbeute φ für *Chlorella* als Funktion der Kohlensäuredrucke

1-Gefäßmethode. Konstanthaltung der Kohlensäuredrucke durch 2-molare Bicarbonat-Carbonatgemische im Anhänger. Zellen in Kulturlösung K, pH 4,3.

Man beachte in der Abbildung, daß die Quantenausbeute bei dem Kohlensäuredruck von 20 mm Brodie — bei dem Emerson seine „maximalen" Quantenausbeuten zu bestimmen glaubte — nur 0,105 beträgt und erst bei etwa 200 mm Brodie den maximalen Wert = 0,364 erreicht.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 370.

2 Vergleiche die vorhergehende Arbeit.

* Erscheint nicht an anderer Stelle.

** Vgl. die Beiträge Nr. 42, 53 u. 79.

81 3-Hydroxytyramin, ein biologischer Oxydationskatalysator der Photosynthese*

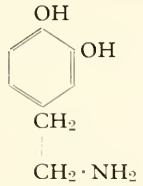
Von Hans-Siegfried Gewitz und Wolfgang Völker

Wie vor kurzem gezeigt worden ist[1], kann man den Oxydationskatalysator der Photosynthese, der im Licht aus grünen Grana Sauerstoff entwickelt, nachweisen und quantitativ bestimmen, indem man in belichteten Grana die Katalase durch n/100 Blausäure hemmt. Dann hat man im Licht die Reaktionen, wenn man den Oxydationskatalysator mit F bezeichnet:

$$2\,F + 2\,H_2O = 2\,FH_2 + O_2 \qquad [1]$$
$$2\,FH_2 + 2\,O_2 = 2\,F + 2\,H_2O_2 \qquad [2]$$
$$2\,H_2O + O_2 = 2\,H_2O_2 \qquad [3]$$

d. h. im Licht wird O_2 verbraucht und H_2O_2 gebildet, und zwar erscheinen 2 Moleküle H_2O_2, wenn 1 Molekül Sauerstoff verschwindet; während bei ungehemmter Katalase das gebildete H_2O_2 wieder zersetzt wird und deshalb die Sauerstoffbilanz Null wird.

Die Bilanzgleichung [3] haben wir als Testreaktion zur Isolierung des Oxydationskatalysators F benutzt. Das Ergebnis ist, daß der biologische Photolyt in Spinatblättern 3-Hydroxytyramin ist,



eine Substanz, die in erhitztem Spinatsaft in Mengen von 0,1 mg pro ccm vorkommt und die wir als Tribenzoylverbindung kristallisiert und analysiert haben. Schmelzpunkt gef. 140°, nach der Literatur 141°. Mischschmelzpunkt mit Tribenzoat aus käuflichem 3-Hydroxytyramin ergab keine Depression.

Analysen. 4,28 mg Subst.: 1,870 mg H_2O = 4,89% H; H: 11,749 mg CO_2 = 74,91% L; 4,779 mg Subst.: 0,1176 cm³ N (24°C, 768 mm Hg) = 2,86% N; berechnet für $C_{29}H_{23}O_5N$: C 74,9%, H 4,99%, N 3,05%.

Die Analysen wurden im Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin von Frau Dr. Fahs ausgeführt.

3-Hydroxytyramin ist zuerst von H. Schmalfuss und A. Heider[2] aus Ginster und von U. S. von Euler[3] aus Säugetierharn isoliert worden.

In unserm Test fanden wir die folgenden Werte an O_2-Verbrauch und H_2O_2-Bildung im Licht, wenn 3-Hydroxytyramin oder Spinat-Hitzesaft zu gewaschenen Spinatgrana zugesetzt wurde:

20°. Gasraum Luft. Versuchszeit 20 Minuten.

---

* Aus Zeitschrift für Naturforschung, September 1961.

3 cm^3 mit Wasser gewaschene Chloroplastensuspensionen aus Neuseeländer Spinat, die 1,3 mg Chlorophyll enthielten, wurden mit J = 36 Mikromolen Quanten (weißes Licht) pro Minute belichtet. Die Suspensionsflüssigkeit enthielt außerdem 100 μMole Phosph. pH 6,8 und 50 μMole KCl.

	+ HCN 30 μMole		— HCN	
	— mm^3 O_2-Aufnahme	+ mm^3 H_2O_2-Bildg.	— mm^3 O_2-Aufnahme	+ mm^3 H_2O_2-Bildg.
1,0 γ 3-Hydroxytyramin	—19,7	+ 37,3	—2—3	0
2,0 γ 3-Hydroxytyramin	—37,3	+ 71,8	(Photo-Oxydation der Lonotinoide)	0
0,01 cm^3 Hitzesaft	—18,8	+ 35,4		0
0,02 cm^3 Hitzesaft	—37,8	+ 71,8		0

Im Dunkeln wurde weder O_2-Verbrauch noch H_2O_2-Bildung gefunden.

Berücksichtigt man die Wirkungsstärken und die Mengen anderer Oxydantien, die neben dem 3-Hydroxytyramin in dem Hitzeextrakt der Spinatblätter gefunden wurden, so kommen als Oxydationskatalysatoren der Photosynthese in Spinatblättern *nicht* in Betracht: Pyridinnukleotide, Flavinnukleotide, Benzochinon, Naphtochinon, Chlorogensäure, Ascorbinsäure, Hydroxytyrosin (Dopa), Vitamin K-Körper (K_1, K_3, Phtiocol), Folsäure, Ubichinon, Kofler-Chinon.

Andererseits kann aus quantitativen Gründen der Oxydationskatalysator der Photosynthese *in Chlorella* nicht Hydroxy-Tyramin sein, sondern ist hier vielleicht Vitamin K — woran schon bei der Entdeckung der Chinonreaktion gedacht worden ist[1] — oder ein Flavin, von dem wir mit der Luminoflavinmethode im Kochsaft von 100 mm^3 Chlorella 0,006 Mikromole gefunden haben, eine Menge, die im Spinattest erhebliche O_2-Übertragung erzeugte.

Herrn Otto Warburg danken wir für die Hilfe bei dieser Arbeit.

Literatur

1 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H.-S., Völker, W., Z. f. Naturforschg. 14b (1959), 712.
2 Schmalfuss, H., und Heider, A., Biochem. Z. 236 (1931), 226.
3 von Euler, U. S., Hamberg, U., und Hellner, S., Biochem. J. 49 (1951), 655.
4 Warburg, O., Heavy Metals and Enzyme Action, Clarendon Press Oxford, S. 201.

82 Weitere Versuche über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel der Krebszellen*

Von O. Warburg, A.-W. Geissler und S. Lorenz

In einer früheren Arbeit haben wir gezeigt[1], daß man mit relativ kleinen Dosen von Röntgenstrahlen die Gärung von Krebszellen hemmen kann, wenn man dünne Zellsuspensionen bestrahlt; daß Zusatz von Katalase die Wirkung der Röntgenstrahlen weitgehend verhindert; und daß man die Röntgenstrahlen ersetzen kann durch „strahlenäquivalente" Mengen von Wasserstoffperoxyd. Aus solchen Versuchen haben wir geschlossen, daß Röntgenstrahlen die Gärung von Krebszellen durch Wasserstoffperoxyd hemmen.

Da aber die Ausbeute an Wasserstoffperoxyd bei der Bestrahlung wäßriger Lösungen von vielen Faktoren abhängt, so ist die „strahlenäquivalente" Menge an Wasserstoffperoxyd eine unsichere Größe**. Wir haben nunmehr diese Unsicherheit eliminiert, indem wir die Bestrahlung der Zellen durch die bestrahlten Lösungen ersetzen, in denen die Zellen suspendiert waren, das heißt, wir bestrahlten neutrale Kochsalz-Phosphatlösungen zunächst ohne Zellen und setzten die Zellen erst im „Dunkeln" zu; oder wir setzten zunächst die Zellen zu den Lösungen und bestrahlten dann die Lösungen zusammen mit den Zellen. In beiden Fällen wurden dann die Gärungen gemessen und mit den Gärungen unbestrahlter Kontrollen verglichen.

Zunächst fanden wir bei derartigen Versuchen wesentlich größere Gärungshemmungen bei Bestrahlung der Zellen als bei Bestrahlung der Lösungen und nachherigem Zusatz der Zellen. Später zeigte sich, daß die Gärungshemmungen sich näherten, wenn die Zellen vor dem Versuch mit dem Komplexbildner Versen (Äthylendiamintetraessigsäure) gewaschen wurden und den Lösungen, in denen bestrahlt wurde, der gleiche Komplexbildner zugesetzt wurde. Offenbar waren Schwermetallspuren, die die Zelloberflächen und Salzlösungen als Verunreinigung enthielten, die Ursache von Wasserstoffperoxydverlusten*** bei Bestrahlung der Lösungen und bei Zusatz der Zellen zu den bestrahlten Lösungen. So ergab sich die folgende Versuchsanordnung:

Ascites-Krebszellen von Mäusen wurden 2mal mit 0,9% NaCl m/100 Phosphat, pH 7,4, unter Zusatz von m/50 oder m/100Versen gewaschen, wodurch anhaftende Metallspuren von den Zellen entfernt wurden. Dann erfolgte die Bestrahlung der Zellen in der gleichen Lösung oder die Bestrahlung der gleichen Lösung ohne die Zellen, die erst nach der Bestrahlung zugesetzt wurden. Bestrahlt wurden immer 3 cm^3 Lösung oder Zellsuspension in unserm Röntgenactinometer[1], dessen Gas-

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

** Bestrahlt man Kochsalzphosphatlösungen ohne Zellen, aber unter Zusatz von n/100 Versen, in Sauerstoff, mit 12000 r (Dosisleistung 1300 r/Minuten), so findet man nicht 1 H_2O_2 auf 2 oxydierte Ferro der Frickelösung (theoretische Ausbeute), sondern nur 1/4 davon.

*** In einer Arbeit über Methämoglobinbildung durch Röntgenstrahlen (Z. f. Naturforschung 15b (1960), 163) fanden wir keine Verluste bei Bestrahlung der Lösungen, obwohl kein Versen zugesetzt war. Hier war die Salzlösung eine andere, und die zeitlichen Versuchsverhältnisse waren andere.

raum Luft enthielt, und das mit einer Frequenz von 160 Exkursionen pro Minute bewegt wurde. Die Temperatur bei der Bestrahlung war etwa 20°. Die Zelldichte betrug 0,5 bis 0,67 mg Trockensubstanz pro cm^3. Die Röntgenstrahlen wurden erzeugt in der Müllerschen Röhre RT 100 mit 100 KV 8 Milliampère Filter 1,7 mm Aluminium, Focusabstand 9,5 cm, Dosisleistung (mit Frickelösung im bewegten Aktinometer gemessen) etwa 1300 r pro Minute, Bestrahlungsdauer 4 bis 8 Minuten, angewandte Röntgen-Dosen also 5000 r bis 10000 r. Nach der Bestrahlung blieben die bestrahlten Gefäße 20 Minuten stehen, um dem Wasserstoffperoxyd Zeit zu geben, mit den Zellen zu reagieren. Dann wurden pro cm^3 2 mg Glukose und 450 mm^3 Natriumbikarbonat zugesetzt, mit 5 Vol.-% CO_2-Argon gesättigt und bei 38° die anaerobe Gärung für 1 Stunde gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch Nr.	Versenkonzentration (Molarität)	Zelldichte (mg/cm^3)	Strahlendosis (r)	Gärungshemmung (%)	
				Lösung bestrahlt	Zellsuspension bestrahlt
1	10^{-2}	0,50	5000	35,4%	51,5%
2	10^{-2}	0,50	6000	53,7%	65,0%
3	10^{-2}	0,50	8000	50,0%	54,0%
4	2×10^{-2}	0,50	5000	35,0%	48,3%
5	2×10^{-2}	0,67	5000	33,0%	47,5%
6	2×10^{-2}	0,67	6500	65,6%	61,8%
7	2×10^{-2}	0,67	9000	45,5%	72,5%
8	2×10^{-2}	0,67	9000	68,0%	66,0%
	Mittlerer Unterschied der Gärungshemmungen:			48,3%	58,3%

Aus der Tabelle ist zu schließen, daß Röntgenstrahlen die Gärung im wesentlichen durch eine Substanz hemmen, die bei der Bestrahlung entsteht und die, in Abwesenheit katalysierender Schwermetalle, relativ beständig, also kein Radikal ist. Daß diese Substanz Wasserstoffperoxyd ist, kann man beweisen, indem man nach der Bestrahlung der Lösungen 5 Mikrogramm Katalase-Boehringer pro cm^3 Lösung zusetzt. Gibt man dann 10 Minuten später die Krebszellen zu der Lösung, so findet man keine Gärungshemmung.

Weiterhin teilen wir in dieser Arbeit Versuche mit, die einwandfreier als unsere früheren Versuche zeigen[2], daß Krebszellen strahlenempfindlicher sind als embryonale Zellen. Bei unseren früheren Versuchen waren Ascites-Krebszellen mit Chorionhäuten verglichen worden, also Krebseinzelzellen mit embryonalen Geweben, was aus Diffusionsgründen nicht einwandfrei war. Wir haben nunmehr die Chorionhäute durch embryonale Einzelzellen ersetzt, die heute in beliebiger Menge durch Trypsinisierung 10tägiger Hühnerembryonen nach DULBECCO-VOGT[3] zur Verfügung stehen.

Abbildung 1 ist die graphische Darstellung eines Versuches, bei dem Ascites-Krebszellen mit frischen embryonalen Zellen und 2 Tage in vitro gezüchteten embryonalen Zellen unter gleichen äußeren Bedingungen mit Röntgendosen von 5000 bis 40000 r bestrahlt wurden.

Der Versuch der Abbildung bestätigt, daß Krebszellen wesentlich strahlen-

empfindlicher sind als embryonale Zellen. Der Katalasewert[4] der hier verwendeten embryonalen Zellen, der frischen wie der 2 Tage in vitro gezüchteten, war im Mittel 15, während der Katalasewert der Ascites-Krebszellen im Mittel 0,7 war.

Die Krebszellen waren Mäuse-Ascites-Zellen, die embryonalen Zellen waren Zellen von Hühnerembryonen, gewonnen nach Dulbecco-Vogt, frisch oder nach 2 Tagen in vitro-Kultur. Bestrahlt wurden je 3 cm³ in 0,9% NaCl m/100 Phosphat, pH 7,4, im bewegten Röntgenactinometer, bei Sättigung mit 100% Sauerstoff.

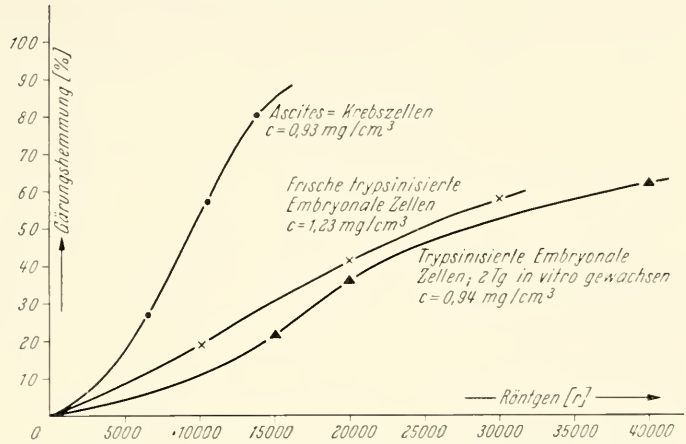


Abb. 1. Hemmung der anaeroben Gärung von Krebszellen und embryonalen Zellen durch Röntgenstrahlen.

Nach der Bestrahlung wurden 2 mg Glukose und 450 mm³ $NaCO_3$ pro cm³ zugesetzt, mit 5 Vol.-% CO_2-Argon gesättigt, und die anaerobe Gärung für 1 Stunde gemessen. Röntgengerät Müller RT 100, 100 KV 8 Milliampère, 1,7 mm Al-Filter, Fokusabstand 9,5 cm. Dosisleistung im Mittel 1300 r/Minuten, mit der Frickelösung im manometrischen Aktinometer gemessen.

Weiterhin haben wir untersucht, ob Röntgenstrahlen Krebszellen abtöten, weil sie ihre Gärung hemmen, oder auf andere Weise. 24 mm³ Ascites-Zellen, die in 4 cm³ 0,9% NaCl n/100 Phosphat pH 7,4 suspendiert waren, wurden im Röntgenaktinometer mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt und dann in das Abdomen von Mäusen geimpft, wo unbestrahlte Zellen nach 7 Tagen deutliches Wachstum zeigten. Waren die bestrahlten Zellen nach 1 Woche nicht angegangen, so gingen sie auch nach weiteren 3 Wochen nicht an und wurden dann als abgetötet betrachtet.

Bei derartigen Versuchen, die mit Gärungsmessungen verbunden wurden, ergab sich, daß Röntgen-Dosen von 3000 r, bei Zelldichten von 1 mg Trockensubstanz/cm³, Mäuse-Ascites-Krebszellen abtöten, das sind Dosen, die unter den gleichen Bestrahlungsbedingungen noch keine wesentlichen Gärungshemmungen erzeugen. Röntgenstrahlen töten also Krebszellen nicht durch Schädigung ihrer Gärung ab, sondern auf einem anderen Weg. Mit Hilfe von Katalase wird es möglich sein, festzustellen, ob auch das *Abtöten* der Krebszellen, ebenso wie die *Gärungshemmung*, durch Wasserstoffperoxyd bewirkt wird.

Literatur

1 Warburg, O., Schröder, W., Gewitz, H.-S., und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 13b (1958), 591.
2 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Z. f. Naturforschg. 12b (1957), 393.
3 Dulbecco, R., und Vogt, M., J. exp. Medicine 99 (1954), 167.
4 Vgl. dazu auch Warburg, O., Schröder, W., und Gattung, H.-W., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 163.

83 Über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel von Milchsäurebakterien*

Von Otto Warburg und Detlev Kayser

Da der Stoffwechsel der fakultativ anaeroben Milchsäurebakterien dem Stoffwechsel der Krebszellen ähnlich ist, haben wir uns gefragt, ob auch im Falle der Milchsäurebakterien die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel wie bei den Krebszellen über Wasserstoffperoxyd geht[1].

Als Versuchsmaterial benutzten wir einen Stamm von Laktobazillus Delbrückii aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin** und einen Stamm von Bakterium lactis aerogenes der American Type Culture Collection (Sortimentnummer ATCC 211), die beide fakultative Anaerobier sind. Der Berliner Stamm des Laktobazillus hat fast keine Atmung und eine reine Milchsäuregärung (Q_M^{Argon} = im Mittel 70); das amerikanische Bakterium lactis aerogenes hat eine erhebliche Atmung (Q_{O_2} = — 200 bis — 250) und eine gemischte Gärung, deren Endprodukte unter anderem Milchsäure, Kohlensäure und Wasserstoff sind. Wir bezeichnen im folgenden das Berliner Bakterium als „nicht atmendes Bakterium" und das amerikanische Bakterium als das „atmende Bakterium". Das nicht atmende Bakterium hat keine Katalase, keine Peroxydase und keine Eisenoxygenase. Das atmende Bakterium dagegen hat Katalase und atmet mit Eisenoxygenase. Anaerob wachsen beide auf Kosten ihrer Gärung. Aerob wächst das nicht atmende Bakterium weiter unverändert auf Kosten seiner vollen Gärung, während das atmende Bakterium aerob wie Krebszellen auf Kosten eines Gemisches von Atmung und verminderter Gärung wächst. Beiden Bakterien kann der Sauerstoff nicht schaden, da das erste kaum atmet, während das zweite etwa gebildetes Wasserstoffperoxyd durch seine Katalase zerstören kann.

Beide Zellarten wurden aerob gezüchtet auf Nährböden, deren Zusammensetzung am Ende der Arbeit beschrieben ist.

Wir haben die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel des nicht atmenden Bakteriums durch die Hemmung seiner anaeroben Gärung gemessen. Strahlenquelle war eine Röntgenröhre RT 100 der Firma Müller, Hamburg (100 kV, 8 mA, 1,7 mm Al-Filter). Bestrahlt wurde mit 6,5 cm Focusabstand im Röntgenaktinometer, in dem auch die Röntgendosis mit Frickescher Lösung bestimmt wurde[1]. Die Zellen waren zum Bestrahlen in m/100 Phosphat, pH = 6,8, suspendiert. Nach dem Bestrahlen wurde noch 30 Minuten gewartet, ehe 1,7 mg Glucose/cm³ und 166 mm³ CO_2/cm³ als $KHCO_3$ zugesetzt wurden. Nach Sättigen mit 5% CO_2 in Argon wurde bei 38° die anaerobe Gärung gemessen und mit einer unbestrahlten Probe verglichen. Der pH-Wert betrug hier 7,1.

Im Falle des atmenden Bakteriums war der Test auf Strahlenwirkung nicht die

---

* Die ausführliche Arbeit wird auch als Dissertation an der Technischen Universität Berlin eingereicht.

** Herrn Dr. Imeis vom Institut für Gärungsgewerbe danken wir auch hier für die Überlassung einer Stammkultur und Ratschläge für die Züchtung.

Gärungshemmung, sondern die Atmungshemmung, und zwar die Hemmung der Verbrennung von Milchsäure zu CO_2 und Wasser. Die Zellen wurden in m/40 Phosphat, pH = 7,1, suspendiert und wie oben bestrahlt. Nach dem Bestrahlen wurde 30 Minuten gewartet und dann 2,9 mg Li-Laktat/cm³ zugesetzt. Der Sauerstoffverbrauch der Atmung wurde nach Sättigen mit Luft bei 38° mit KOH in der Wanne gemessen und mit einer unbestrahlten Probe verglichen. Das Gemisch der Gärungen dieses Bakteriums stört den Atmungstest nicht, da als Substrat nur Milchsäure und kein Zucker verwendet wurde, eine Gärung also nicht stattfinden konnte. Bei der Veratmung des zugesetzten d, l-Li-Lactats wurde pro Mol aufgenommenen Sauerstoffs ein Mol CO_2 abgegeben, γ betrug also hier 1.

I. Versuche mit dem atmenden Milchsäurebakterium (Bacterium lactis aerogenes)

1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der Zelldichte

Die folgende Tabelle gibt an, welche Atmungshemmung man bei verschiedenen Röntgendosen erhält, wenn man die Bakteriendichte von 0,1 mm³/cm³ bis 0,4 mm³/

Röntgendosis (r)	Hemmung der Atmung bei der Bakteriendichte		
	0,1 mm³/cm³	0,2 mm³/cm³	0,4 mm³/cm³
7 000	11%	7%	—
14 000	33%	16%	6%
21 000	55%	30%	15%
28 000	63%	46%	28%
35 000	—	56%	39%
42 000	73%	63%	46%
56 000	—	70%	55%

cm³ variiert. 0,1 mm³ Bakterien entsprechen einem Trockengewicht von 34 γ. Es wurde in Luft mit einer Dosisleistung von 1400 r pro Minute bestrahlt.
Aus der Tabelle geht hervor, daß die Atmung durch eine Substanz gehemmt wird, die sich in der bestrahlten Lösung bildet.

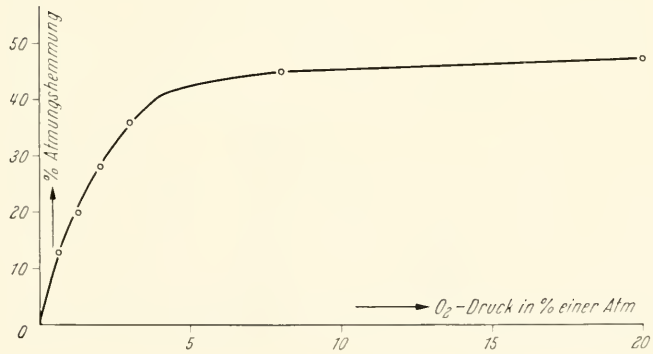


Abb. 1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Sauerstoffdruck. Zelldichte: 0,2 mm³/cm³; Röntgendosis: 28000 r (Dosisleistung 1400 r/Minute).

2. Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Sauerstoffdruck

Wurde bei konstanter Zelldichte von 0,2 mm^3/cm^3 mit einer Röntgendosis von 28000 r bestrahlt und wurde der Sauerstoffdruck von 0% bis 20% in Argon variiert, so wurde ohne Sauerstoff nur eine sehr kleine Strahlenwirkung gefunden, bei 1,8% O_2 in Argon die halbe Strahlenwirkung und bei 8% O_2 in Argon die volle Strahlenwirkung. Abbildung 1 ist eine graphische Darstellung dieses Versuches.

3. Zusatz von Katalase bei der Bestrahlung

Wurden die Bakterien unter Zusatz von Katalase bestrahlt, so wurde die Strahlenwirkung wesentlich vermindert. Bestrahlt man mit einer Dosisleistung von 1400 r/Minute bei Sättigung mit Luft und beträgt die Zelldichte von 0,1 mm^3/cm^3, so ergeben sich bei verschiedenen Röntgendosen bei Zusatz von aktiver Katalase und hitze-inaktivierter Katalase folgende Werte:

Röntgendosis (r)	Hemmung der Atmung		
	ohne Zusatz	mit 10 γ Katalase/cm^3	
		aktiv	hitze-inaktiviert
14 000	33%	*10%*	32%
21 000	55%	*19%*	52%
28 000	63%	*29%*	64%

4. Bestrahlung des Suspensionsmediums ohne Zellen

Wurde das Suspensionsmedium ohne Zellen bestrahlt und wurden erst dann die Zellen zugesetzt, so wurde keine Wirkung der bestrahlten Lösung auf die Zellen gefunden. Wurde aber das Suspensionsmedium unter Zusatz von m/1000 Blausäure und m/100 Versen (Aethylendiamintetraessigsäure) bestrahlt und wurden erst dann die Zellen zugesetzt, so wurden 70 bis 80% der Hemmung wiedergefunden, die man beim direkten Bestrahlen der Zellsuspension unter gleichen Bedingungen erhält. Wurde nach dem Bestrahlen des Versen-Suspensionsmediums Katalase zugesetzt und erst 10 Minuten später die blausäurehaltigen Zellen, so wurde keine Wirkung des bestrahlten Suspensionsmediums gefunden. Zum Beispiel fanden wir mit einer Dosisleistung von 1400 r/Minute bei einer Zelldichte von 0,1 mm^3/cm^3, wenn wir in Luft bestrahlten, folgende Werte:

Röntgendosis (r)	Hemmung der Atmung		
	Lösung mit Zellen bestrahlt	Lösung ohne Zellen bestrahlt	$\frac{b}{a}$ 100
7 000	22%	15%	68%
10 500	38%	26%	68%
14 000	50% = a	36% = b	72%
21 000	64%	50%	78%
28 000	69%	55%	80%
		Mittelwert	73%

Zu diesen entscheidenden Versuchen ist zu bemerken:

a) daß nach dem Zusetzen der Zellen zu dem bestrahlten Medium 10 Minuten bis zum Zusatz des Li-Laktats gewartet und daß dann die Blausäure vor der Atmungsmessung mit Luft ausgetrieben wurde, da Blausäure die Atmung der Milchsäurebakterien hemmt.

b) daß in jedem Falle, ob mit Zellen oder ohne Zellen bestrahlt wurde, immer eine unbestrahlte Kontrolle angesetzt wurde, die zur Berechnung der Strahlenwirkung diente.

c) daß es der Zweck des Versens ist, die zu bestrahlende Lösung von verunreinigenden Schwermetallen zu befreien, die H_2O_2 zersetzen.

d) daß es der Zweck der Blausäure ist, die Katalase ($Q_{Kat.}$ etwa 14) der Milchsäurebakterien zu hemmen, die andernfalls bei Zusatz zu der bestrahlten Lösung H_2O_2 zersetzen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Röntgenstrahlen wirken auf die Atmung des Bakteriums lactis aerogenes durch das Wasserstoffperoxyd, das die Strahlen in dem Suspensionsmedium erzeugen. Die Strahlenwirkung ist abhängig von der Zelldichte und dem Sauerstoffdruck, sie wird durch Zusatz von Katalase weitgehend aufgehoben, und — am wichtigsten — die Strahlenwirkung wird zu 70% bei Bestrahlung des Suspensionsmediums und nachherigem Zusetzen der Zellen wiedererhalten. Diese Wirkung wird durch Zusatz von Katalase zu der bestrahlten Lösung aufgehoben. Radikale können bei diesen Versuchen nicht Träger der Strahlenwirkung sein, da sie zu kurzlebig sind.

II. Versuche mit dem nicht atmenden Milchsäurebakterium (Laktobazillus Delbrückii)

1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der Zelldichte

Als Test der Strahlenwirkung diente hier die Hemmung der anaeroben Gärung, die wie oben beschrieben gemessen wurde. 1 mm^3 Bakterien entsprach hier 0,34 mg Trockengewicht. Bestrahlten wir nach Sättigung mit Luft mit einer Dosisleistung von 1500 r/Minute und mit Zelldichten von 0,5 mm^3/cm^3 und 1,0 mm^3/cm^3, so fanden wir mit verschiedenen Röntgendosen:

Röntgendosis (r)	Hemmung der anaeroben Gärung	
	0,5 mm^3 Bakterien/ cm^3	1,0 mm^3 Bakterien/ cm^3
15 000	7%	5%
22 500	24%	13%
30 000	50%	21%
37 500	73%	36%
45 000	82%	51%

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Gärung durch eine Substanz gehemmt wird, die sich in der bestrahlten Lösung bildet.

2. Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Sauerstoffdruck

Wurde bei der konstanten Zelldichte von 0,5 mm^3/cm^3 mit einer Röntgendosis von 26000 r (Dosisleistung 1300 r/Minute) bestrahlt und wurde der Sauerstoffdruck von 0% bis 20% O_2 in Argon variiert, so wurden die in Abbildung 2 graphisch dargestellten Werte gefunden.

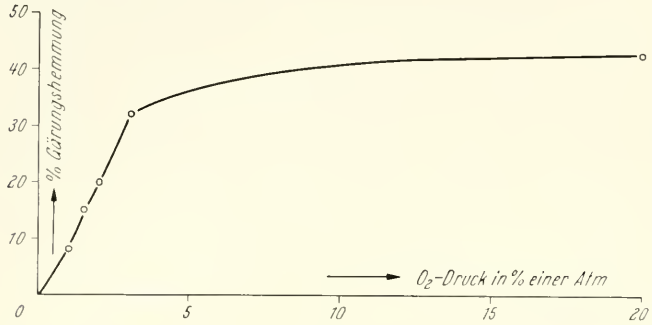


Abb. 2. Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Sauerstoffdruck. Zelldichte: 0,5 mm^3/cm^3; Röntgendosis: 26000 r (Dosisleistung 1300 r/Minute).

3. Zusatz von Katalase bei der Bestrahlung

Wir fanden bei einer Zelldichte von 0,5 mm^3/cm^3 in Luft und bei einer Dosisleistung von 1500 r/Minute mit verschiedenen Röntgendosen:

Röntgendosis (r)	Hemmung der anaeroben Gärung		
	ohne Zusatz	mit 10 γ Katalase/cm^3	
		aktiv	hitze-inaktiviert
45 000	78%	*25%*	75%
45 000	80%	*19%*	—
30 000	63%	*10%*	63%
30 000	67%	*6%*	—
15 000	12%	keine	—

4. Bestrahlung des Suspensionsmediums ohne Zellen

Während bezüglich Zelldichte, Sauerstoffdruck und Katalase-Zusatz das nicht atmende Bakterium sich sehr ähnlich verhielt wie das atmende Milchsäurebakterium, konnte hier Versen als Komplexbildner nicht wie vorher verwendet werden, da Versen in sehr kleinen Dosen die Strahlenwirkung aufhebt, nicht etwa, weil Versen H_2O_2 verbraucht, sondern weil Versen Metallspuren bindet, die bei diesem Bakterium für die Strahlenwirkung notwendig sind; eine interessante Tatsache, deren Ursache unbekannt ist. Vielleicht gehört zu jeder Wirkung des durch Röntgenstrahlen gebildeten H_2O_2 eine Peroxydase, deren Funktion im Bakterium lactis aerogenes und in Krebszellen durch Katalase (die durch Versen nicht hemmbar ist) im Sinne von Aebi[2] ausgeübt wird und die hier durch Metallspuren ausgeübt wird.

Trotzdem kann auch hier wahrscheinlich gemacht werden, daß man die Strahlenwirkung durch das bei der Bestrahlung gebildete H_2O_2 ersetzen kann. Eine m/100 Phosphatlösung, pH = 6,8, die in bezug auf Versen m/10000 war, wurde

mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt und die Menge an gebildetem H_2O_2 wurde mit o-Dianisidin und Peroxydase nach AEBI[2] bestimmt, wie es im experimentellen Teil beschrieben ist. Die so gefundene Menge H_2O_2 wurde dann zu Zellsuspensionen zugesetzt und nach 30 Minuten Wartezeit wurde die Gärungshemmung wie nach der Bestrahlung gemessen. Im Mittel 89% der Strahlenwirkung wurde dann durch Zusatz des Wasserstoffperoxyds ohne Bestrahlung wiedergefunden. Zum Beispiel fanden wir für eine Zelldichte von 0,5 mm^3/cm^3, in Luft und bei einer Dosisleistung von 1500 r/Minute:

Röntgendosis (r)	H_2O_2, gebildet beim Bestrahlen der Lösung (μMole/cm^3)	Hemmung der Gärung		H_2O_2-Wirkung / Strahlenwirkung. (%)
		durch Bestrahlung (%)	durch H_2O_2 (%)	
15 000	0,0373	7	9	100
22 500	0,0548	24	21	88
30 000	0,0755	50	43	86
37 500	0,0932	73	61	84
45 000	0,1056	82	70	86
			Mittelwert	89

Anmerkung: Die Ausbeute an H_2O_2 bei diesen Bestrahlungsversuchen war 30% der theoretischen Ausbeute (theoretische Ausbeute = 1 Molekül H_2O_2, wenn 2 Atome Ferro der Frickeschen Lösung durch die Bestrahlung zu Ferri oxydiert werden).

Wurde die Phosphatlösung ohne Versen bestrahlt, so wurde bei gleichen Röntgendosen wesentlich weniger H_2O_2 gefunden, so daß die Quotienten H_2O_2-Wirkung/Strahlenwirkung wesentlich niedriger lagen. — Der Einwand, daß auch die direkte Bestrahlung der Zellsuspension wirksamer in m/10000 Versen gewesen wäre, ist wahrscheinlich nicht ernst, da Zellen, deren Strahlenempfindlichkeit durch Versen nicht aufgehoben wird, wie Bakterium lactis aerogenes und Krebszellen, bei gleicher Röntgendosis mit und ohne Versen die gleiche Stoffwechselhemmung zeigten.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Röntgenstrahlen wirken auf die Gärung des Laktobazillus Delbrückii über Wasserstoffperoxyd. Die Strahlenwirkung ist auch hier abhängig von der Zelldichte und dem Sauerstoffdruck und sie wird durch Zusatz von Katalase weitgehend aufgehoben. Obgleich es hier aus methodischen Gründen nicht möglich war, die direkte Strahlenwirkung durch die bestrahlte Lösung zu ersetzen, so konnte doch sehr wahrscheinlich gemacht werden, daß man auch hier etwa 90% der Strahlenwirkung durch Zusatz des gebildeten H_2O_2 ohne Bestrahlung wiederfinden kann.

Zum Schluß sei darauf aufmerksam gemacht, daß beide Bakterienarten, Bakterium lactis aerogenes und Laktobazillus Delbrückii, etwa gleich strahlenempfindlich sind, obwohl das eine Katalase enthält und das andere nicht. Nach den Versuchen mit Krebszellen und embryonalen Zellen hätte erwartet werden können, daß die Bakterien, die keine Katalase enthalten, besonders strahlenempfindlich sind. Offenbar bestimmt der Katalasegehalt nicht alleine, sondern nur ceteris paribus die Strahlenempfindlichkeit.

III. Experimenteller Teil

1. Züchtung der Bakterien

Als Kulturmedium für Laktobazillus Delbrückii wurde eine Nährlösung folgender Zusammensetzung verwendet:

1000 ml Malzmaische mit 10% Zuckergehalt
5 ml Hefeautolysat (aus Preßhefe)
10 g Pepton (aus Casein, tryptisch verdaut)
10 g Glucose
5 g Lactose
20 g Kreide ($CaCO_3$, pulverisiert)

Der Bakterienstamm wurde als Stichkultur in Difco „Micro Assay Culture Agar" gehalten und immer neu auf Nährlösung übergeimpft, die sich in Portionen zu 40 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben befand. Nach Stehenlassen der angeimpften Nährlösung bei 38° für 48 bis 55 Stunden wurden die Bakterien durch fraktioniertes Zentrifugieren daraus gewonnen.

Bakterium lactis aerogenes wurde als Oberflächenkultur auf Difco „Micro Assay Culture Agar" gezüchtet, mit der Platinschlinge vorsichtig abgehoben und direkt zum Versuch suspendiert. Die Züchtung erfolgte bei 38° über 15 bis 20 Stunden.

2. Bestimmung des Wasserstoffperoxyds

Nach Aebi[2] kann das in bestrahlten Lösungen gebildete Wasserstoffperoxyd durch Zugabe von o-Dianisidin und Peroxydase bestimmt werden. Die Peroxydase überträgt das H_2O_2 auf das o-Dianisidin und bildet so einen braungelben Farbstoff, dessen Absorption bei 436 mμ gemessen werden kann. 4 ml bestrahlte Phosphatlösung, die in bezug auf Versen m/10000 war, wurden mit 4 ml o-Dianisidin-Lösung versetzt und kurz nacheinander die dem Versen äquivalente Menge Ferri-Nitrat und 0,1 ml Peroxydase-Lösung zugegeben. Nach kräftigem Umschütteln wurde innerhalb von 10 Minuten die Absorption gegen eine mit unbestrahlter Phosphatlösung bereitete Probe gemessen. Eisensalz wurde zugegeben, um das Versen, das die Peroxydase hemmen würde, zu binden. Die Peroxydase-Lösung bestand aus 5 mg Peroxydase II von Boehringer in 1 ml dest. Wasser. Zur Herstellung der o-Dianisidin-Lösung gibt man 10 mg o-Dianisidin (Eastman), gelöst in 2 ml Aceton, zu 150 ml m/15 Phosphatpuffer, pH = 7,0. Die H_2O_2-Konzentration berechnet sich aus der gemessenen Absorption nach der Gleichung

$$C_{H_2O_2} = \frac{\ln \frac{Io}{I}}{d \cdot \beta} = \mu\text{Mol/cm}^3,$$

wobei d den Lichtweg in cm bedeutet und β den Absorptionskoeffizienten, der bei 436 mμ = 18,5 $cm^2/\mu Mol$ gefunden wurde.

Literatur

1 Warburg, O., Schröder, W., Gewitz, H.-S., und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 13b (1958), 591.

2 Aebi, H., und Mitarbeiter, Helv. Chim. Acta 42 (1959), 2531.

84 Über Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll*

Von O. Warburg, G. Krippahl, H. S. Gewitz und W. Völker

Da zur Zeit zur Diskussion steht, ob belichtetes Chlorophyll ein Glied in der Oxydationskette ist, die den Photolyten der Photosynthese zu einer Perkohlensäure oxydiert, so haben wir die Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll oder durch belichtete Chlorophyllderivate unter Bedingungen untersucht, die physiologischer sind, als in unserem Quantenactinometer[1], in dem Chlorophyll, gelöst in Pyridin, Sauerstoff auf Thioharnstoff überträgt.

Wir ersetzten das Pyridin des Actinometers durch wäßrige Phosphatlösungen. Wir benutzten als Acceptoren Thioharnstoff oder Hydroxy-Tyramin oder Hydrochinon oder Ascorbinsäure. Wir benutzten als Sauerstoffüberträger belichtete Chlorella oder belichteten Schallextrakt von Chlorella oder belichtetes Chlorophyllin oder belichtetes Chlorin, ein magnesiumfreies Chlorophyllderivat. Alle 4 Sauerstoffüberträger fluoreszieren.

Thioharnstoff wurde als Acceptor gewählt wegen unserer Erfahrung mit diesem Acceptor im Quantenactinometer, in dem man die Quantenausbeute der Sauerstoffübertragung 1 erreichen kann. Thioharnstoff hat jedoch den Nachteil, daß man nicht feststellen kann, ob bei der Sauerstoffübertragung primär Wasserstoffperoxyd entsteht, da Wasserstoffperoxyd zu schnell mit Thioharnstoff reagiert. Hydroxy-Tyramin wurde als Acceptor gewählt, weil diese Substanz in Spinatblättern, wie kürzlich entdeckt wurde (Beitrag 81), ein Glied der Oxydationskette ist, die den Photolyten oxydiert. Wasserstoffperoxyd reagiert bei pH 6,8 nur langsam mit Hydroxy-Tyramin und kann deshalb bei der Sauerstoffübertragung nachgewiesen werden. Das gewöhnliche Hydrochinon ist zwar kein natürlicher Acceptor, hat aber gegenüber Hydroxy-Tyramin den Vorzug, daß das Oxydationsprodukt, das gewöhnliche Chinon, in vitro weniger Sekundärreaktionen veranlaßt als das reaktionsfähigere Orthochinon, das bei der Oxydation des Hydroxy-Tyramins entsteht. Ascorbinsäure wählten wir als Acceptor, weil Ascorbinsäure ein normaler Bestandteil der grünen Grana ist.

Ein allgemeines Ergebnis unserer Versuche ist, daß Chlorophyllderivate auch in wäßriger Lösung, bei neutraler Reaktion, Sauerstoff mit guter Quantenausbeute übertragen können, zum Beispiel mit der Quantenausbeute

$$\varphi = \frac{\text{Mole } O_2}{\text{Mole Quanten}} = 0{,}5$$

und zweitens, daß auch Chlorophyll, in seiner natürlichen Bindung in Chlorella, Sauerstoff übertragen kann, allerdings mit 50 bis 100mal schlechterer Quantenausbeute, aber, wenn man stark belichtet, noch mit sehr großen manometrischen Ausschlägen.

Die große Verschiedenheit der Quantenausbeuten bei der Sauerstoffübertragung auf Thioharnstoff durch Chlorophyll in Chlorella einerseits und durch Chloro-

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

phyllin in Phosphatlösungen andererseits ist wahrscheinlich zu erklären durch die Tatsache, daß man die guten Quantenausbeuten nur dann findet, wenn die Thioharnstoff-Konzentration sehr groß ist im Vergleich zur Farbstoff-Konzentration. Ein solches Verhältnis in Chlorella herzustellen, ist unmöglich, da die Chlorophyll-Konzentration in Chlorella gegeben ist, und man mit der Thioharnstoff-Konzentration nicht über 1/1 molar hinausgehen kann.

Ein weiteres Ergebnis unserer Versuche ist, daß bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyllderivate, z. B. auf Hydrochinon in wäßriger Lösung, eine dem Sauerstoffverbrauch äquivalente Menge an Wasserstoffperoxyd gefunden wird (das man bei der Sauerstoffübertragung auf Thioharnstoff wegen der erwähnten Reaktion des H_2O_2 mit Thioharnstoff nicht finden kann). Diese Bildung von Wasserstoffperoxyd bei der Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll wird erklärt durch die auf diesem Gebiet grundlegenden Arbeiten* von MOUREU und DUFRAISSE und von WINDAUS und BRUNKEN. MOUREU und DUFRAISSE[2] isolierten im Jahr 1926 das erste primäre Photoperoxyd, das Rubrenperoxyd, das bei der Bestrahlung des Farbstoffs Rubren mit sichtbarem Licht quantitativ entsteht und erst bei höherer Temperatur wieder in Sauerstoff und Rubren dissoziiert. WINDAUS und BRUNKEN[3] übertrugen Sauerstoff durch belichtetes Eosin auf Ergosterin und isolierten Ergosterin-Peroxyd, das erste sekundäre, durch *Übertragung* des Sauerstoffs entstandene Photoperoxyd. Die Bildung des Wasserstoffperoxyds bei der Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll auf Hydrochinon ist also folgendermaßen zu schreiben:

$$\text{Pigment-}O_2 + R\,H_2 = \text{Pigment} + R + H_2O_2$$

Oder, worauf es uns ankommt: Findet man H_2O_2 bei der Reoxydation eines Oxydans im Verlauf der Photosynthese, so ist damit keineswegs eine Autoxydation bewiesen, sondern es kann auch eine Übertragung von Sauerstoff über ein Peroxyd vorliegen.

Die Sauerstoffübertragungen wurden manometrisch gemessen. Sollten die Quantenausbeuten der Sauerstoffübertragungen bestimmt werden, so wurde das eingestrahlte Licht bolometrisch, die Absorption des Lichts mit der Ulbrichtschen Kugel gemessen, in deren Mittelpunkt die Manometriegefäße wie bei den Sauerstoffübertragungen bewegt wurden. Daß die Sauerstoffübertragungen im Licht in jedem Fall von Chlorophyll oder seinen im rot absorbierenden Derivaten herrührte, wurde durch Bestrahlung mit rotem Licht bewiesen.

1. Chlorella und Thioharnstoff

100 cmm Chlorella (A-Zellen) wurden in 3 ccm Salzlösung S pH 3,8, in kegelförmigen Manometriegefäßen suspendiert. Die Ansatzbirne enthielt 150 mg

* *Zusatz August 1961.* Neben diesen Arbeiten sind als grundlegend auf dem Gebiet zu nennen die Messung des Quantenbedarfs bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll in nichtwäßrigen Lösungen sowie bei der Bildung des Photoperoxyds des Rubrens, beides Arbeiten, die mit meiner Apparatur, mit meiner Hilfe und auf meine Anregung ausgeführt worden sind und bei denen Bedingungen gefunden worden sind, unter denen 1 absorbiertes Lichtquantum die Aufnahme von 1 O_2 bewirkt. Vergl. H. GAFFRON, Chem. Ber. 60, 755. 1927 und Bioch. Z. 264, 251, 1933.

trockenen Thioharnstoff, der bei t_0 in den Hauptraum gegeben wurde und hier eine Konzentration von 0,66 Molen/Liter erzeugte. Die Temperatur war 20°, der Sauerstoffdruck 1 Atmosphäre, die eingestrahlte Intensität roten Lichts (Wellenlänge kürzer als 700 mμ) betrug 22,4 Mikromole = 500 cmm Quanten pro Minute. Das Ergebnis ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Im Dunkeln ist der Sauerstoffverbrauch gering. Der Sauerstoffverbrauch im Licht erscheint mit einer gewissen Latenzzeit, die wahrscheinlich die Zeit ist, in der die Außenkonzentration des Thioharnstoffs im Innern der Chlorella erreicht wird.

Die Variationen der äußeren Bedingungen ergaben: Erhöhung der Chlorellamenge von 100 auf 500 cmm Zellen in 3 ccm Phosphatlösung erhöhte die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme auf das Doppelte, obwohl 100 cmm Zellen das Licht bereits fast vollständig absorbierten.

Erhöhung des Sauerstoffdrucks von $^1/_{20}$ auf $^1/_1$ Atmosphäre ergab keine wesentliche Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit.

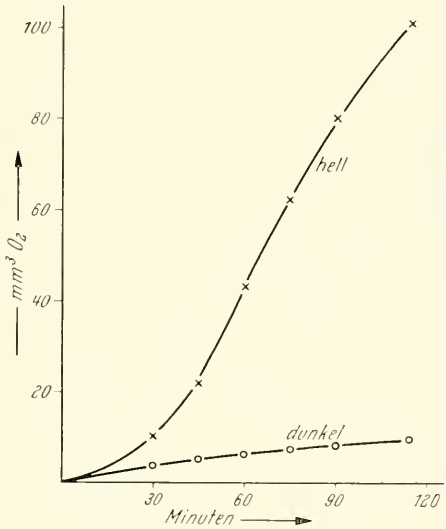


Abb. 1. Sauerstoffübertragung durch belichtete Chlorella auf Thioharnstoff.

MARINE BIOLOGICAL LIBRARY WOODS HOLE MASS.

Erhöhung der Lichtintensität von 10 bis 200 cmm Quanten pro Minute ergab proportionale Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit.

Erhöhung der Thioharnstoffkonzentration ergab Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit, bis bei $^1/_2$ molar Thioharnstoff ein Grenzwert erreicht war.

Es hat keinen Einfluß auf die Sauerstoffübertragung, wenn man statt in Sauerstoff in 20 Vol.-% CO_2—O_2 belichtet. Dies kann man zeigen, indem man Chlorella in Kulturlösung bei pH 4,3 suspendiert, unter Zusatz von 10^{-3} normal ortho-Phenanthrolin suspendiert und unter Zusatz von Thioharnstoff belichtet. Dann ist die Photosynthese Null und stört also nicht die manometrische Messung der Sauerstoffübertragung auf Thioharnstoff.

Der Quantenbedarf der Sauerstoffübertragung auf Thioharnstoff war nur wenig abhängig von der Lichtintensität und von der Chlorophyllmenge pro ccm Phosphatlösung, aber stark abhängig von der Thioharnstoffkonzentration bis hinauf zu Thioharnstoffkonzentrationen von $^1/_2$ molar. Bezeichnen wir mit c_{Thio} die Mikro-

mole Thioharnstoff pro ccm Phosphatlösung, mit c_{Chloro} die Mikromole Chlorophyll pro ccm Phosphatlösung, mit $c^{\star}_{Chloro}$ die Mikromole Chlorophyll pro Chlorella oder, noch korrekter, ccm Chlorella-*Grana*, und mit J die cmm Quanten rotes Licht pro Minute, so fanden wir zum Beispiel:

c_{Thio}	c_{Chloro}	$c^{\star}_{Chloro}$	$\frac{c_{Thio}}{c_{Chloro}}$	$\frac{c_{Thio}}{c^{\star}_{Chloro}}$	J_{rot} eingestrahlt	J_{rot} absorbiert	$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Mole } O_2}$
666	0,433	~ 130	1530	5,1	500	450	*350*

2. Schallextrakt von Chlorella. Thioharnstoff

2000 cmm Chlorella (2tägige Nordzellen) wurden 1mal in Wasser gewaschen, dann in 50 ccm aufgenommen und mit 200 Watt und 10 kc der Firma Raytheon 5 Minuten beschallt. Dann wurde 10 Minuten bei 1800 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit, die das Chlorophyll in sehr kleinen Grana enthält, bezeichnen wir als „Schallextrakt". Er enthält pro ccm den Inhalt von etwa 30 ccm Zellen mit etwa $^1/_3$ Mikromole Chlorophyll und ist für viele Zwecke ein günstigeres Versuchsobjekt als Spinatgrana. Insbesondere erhält man schnelle Sauerstoffentwicklungen durch Chinon und Ferricyanid mit guter Sauerstoffausbeute, ohne daß man die Zwischenflüssigkeit entfernen muß, also unter Bedingungen, die den physiologischen Bedingungen näherkommen als beim Arbeiten mit den gewaschenen Spinat-

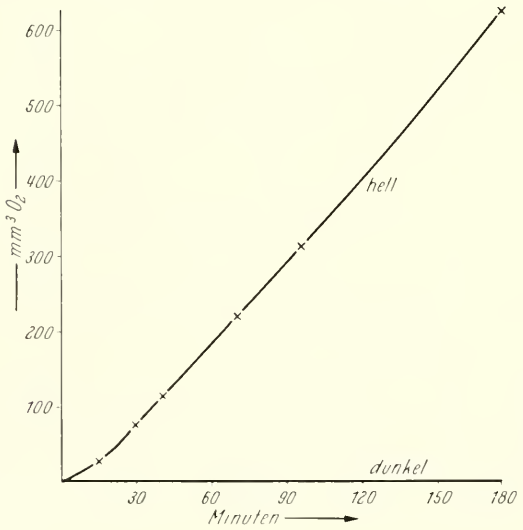


Abb. 2. Sauerstoffübertragung durch Chlorella-Schallextrakt auf Thioharnstoff.

grana. Auch zur Untersuchung der Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll ist Schallextrakt von Chlorella ein günstigeres Versuchsobjekt, als Spinatgrana.

Zur Untersuchung der Sauerstoffübertragung auf Thioharnstoff wurden z. B. 3 ccm Schallextrakt mit 0,3 ccm m/2 Phosphat (pH 6,8) und 0,06 ccm m/2 Chlorid in ein Manometriegefäß gebracht. Die Temperatur war 20°. Der Gasraum ent-

hielt reinen Sauerstoff. Bei t_0 wurden 150 mg trockener Thioharnstoff aus der Ansatzbirne in den Hauptraum gegeben und dann sofort 800 cmm Quanten weißes Licht pro Minute eingestrahlt. In Abb. 2 ist der zeitliche Verlauf des Sauerstoffverbrauchs im Dunkeln und im Licht graphisch dargestellt.

Der Quantenbedarf der Sauerstoffübertragung war nur wenig abhängig von der Lichtintensität und von der Chlorophyllmenge pro ccm Phosphatlösung, aber stark abhängig von der Thioharnstoffkonzentration bis hinauf zu $^1/_2$ molaren Thioharnstoffkonzentrationen. Bezeichnen wir mit c_{Thio} die Mikromole Thioharnstoff pro ccm Phosphatlösung, mit c_{Chloro} die Mikromole Chlorophyll pro ccm Phosphatlösung, mit c^*_{Chloro} die Mikromole Chlorophyll pro ccm Grana und mit J die cmm eingestrahlten Quanten pro Minute, so fanden wir z. B.:

c_{Thio}	c_{Chloro}	c^*_{Chloro}	$\frac{c_{Thio}}{c_{Chloro}}$	$\frac{c_{Thio}}{c^*_{Chloro}}$	J_{rot} eingestrahlt	J_{rot} absorbiert	$\frac{1}{\varphi} = \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Mole } O_2}$
1150	0,0043	13	270 000	88	80	11,2	*110*

also einen Quantenbedarf von 110 pro Molekül übertragenen Sauerstoff.

3. Chlorophyllin und Thioharnstoff

„Iso-Chlorophyllin" entsteht nach WILLSTAETTER und STOLL[4], wenn man aus Chlorophyll die Phytyl- und Methylester durch heißes Alkali abspaltet und dabei die Allomerisierung, das heißt die Oxydation des Kohlenstoffatoms 10, vermeidet. So hergestelltes Chlorophyllin enthält noch das Magnesium des Chlorophylls; es ist als Alkalisalz in Wasser leicht löslich und fluoresziert (nach unsern Messungen in der Ulbrichtschen Kugel) mit einer Quantenausbeute von 4%, wenn man mit 366 mμ anregt. Wir benutzten für unsere Versuche ein Präparat der Firma Merck und nahmen ein Molekulargewicht von 600 an.

Das nach WILLSTAETTER hergestellte Chlorophyllin ist zwar keine reine Substanz, hat aber als Katalysator vor Chlorella und Grana den Vorzug der chemischen Eindeutigkeit, sowie den weiteren Vorzug, daß die Quantenausbeute rund 200mal größer ist als für Chlorophyll, das in Chlorella gebunden ist.

1 mg Chlorophyllin Merck, gelöst 7 ccm m/50 Phosphatlösung pH 7,4 + 300 mg Thioharnstoff. Gasraum reiner Sauerstoff. Temperatur 20°. J eingestrahlt 200 cmm Quanten rotes Licht pro Minute, absorbiert 9,1 cmm Quanten.

In Abb. 3 ist eine Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyllin auf Thioharnstoff graphisch dargestellt. Wegen der größeren Quantenausbeuten war dabei die angewandte Lichtintensität kleiner als in den Versuchen der Abb. 1 und 2.

Unter unsern Versuchsbedingungen nahm die Geschwindigkeit der Sauerstoffübertragung mit der Thioharnstoffkonzentration zu, bis bei m/2 Thioharnstoff ein Grenzwert erreicht war. Die Geschwindigkeit war gleich in Luft und in 100% Sauerstoff. Die Quantenausbeute nahm *ab*, wenn die Chlorophyllinkonzentration *zunahm*, eine Erscheinung, die wir zuerst bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll in nicht wäßrigen Lösungen beobachtet haben[5] und die teilweise

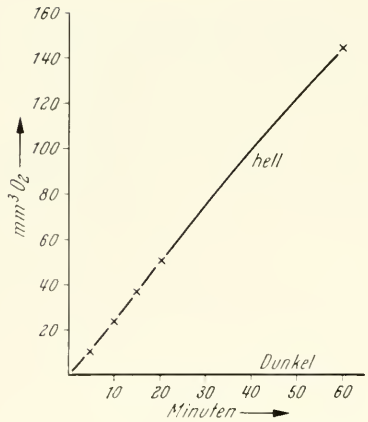


Abb. 3. Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyllin in wäßriger m/50 Phosphatlösung, pH 6,8, auf Thioharnstoff.

erklärt, warum das in Chlorella oder Grana gebundene Chlorophyll mit schlechter Quantenausbeute überträgt.

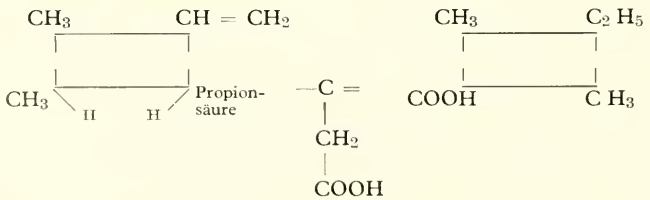
Bezeichnen wir die Konzentration des Thioharnstoffs mit c_{Thio}, die Konzentration des Chlorophyllins mit c_{Chloro} und die Quantenintensität des roten Lichts mit J, so fanden wir

c_{Thio} Mikromole/cm³	c_{Chloro} Mikromole/cm³	$\frac{c_{Thio}}{c_{Chloro}}$	J_{rot} eingestrahlt (cmm Quanten/Min. ⟶)	J_{rot} absorbiert (cmm Quanten/Min. ⟶)	$\frac{1}{\varphi}$ $\frac{h \cdot v}{O_2}$
570	1,43	396	20	16,6	*5,73*
570	0,24	2 380	20	9,1	*3,25*
570	0,024	23 800	20	1,5	*1,73*

Es folgt daraus, daß zum mindesten jedes zweite angeregte Chlorophyllinmolekül Sauerstoff überträgt (während nur ein kleiner Bruchteil der angeregten Moleküle fluoreszierten). Man sieht ferner die Abnahme der Quantenausbeute mit steigender Chlorophyllinkonzentration, die bei Versuchen mit Chlorella oder Grana zu finden, aus methodischen Gründen unmöglich war.

4. Chlorin e und Thioharnstoff

Phytochlorin e entsteht nach Hans Fischer[6] durch Einwirkung von Alkali auf Phaeophorbid a und hat die Formel



Es enthält zwar kein Magnesium, ist aber ein Chlorophyllderivat, das man leicht krystallinisch und chemisch rein erhalten kann und das sich in bezug auf Fluoreszenz Wasserlöslichkeit, Sauerstoffübertragung und Quantenausbeute sehr ähnlich wie das Chlorophyllin verhält.

In Abb. 4 ist eine Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorin graphisch dargestellt. Die Lichtintensität betrug bei diesem Versuch nur 5 cmm Quanten pro Minute und ergab, wie man sieht, trotzdem, wegen der hohen Quantenausbeute, noch hinreichend große manometrische Ausschläge, deren Größe nach 10 Minuten Belichtung konstant wurde.

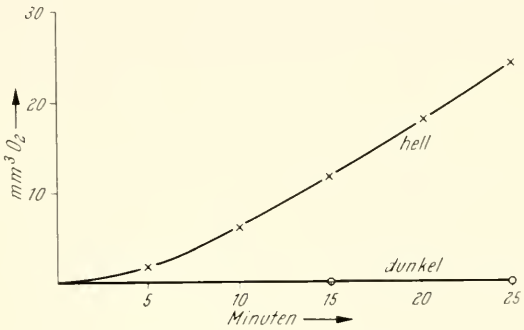


Abb. 4. Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorin in wäßriger Phosphatlösung pH 6,8 auf Thioharnstoff.

Im Hauptraum 7 ccm m/10 Phosphat pH 6,8 + 266 Thioharnstoff (so daß m/2), im Gasraum reiner Sauerstoff, in der Ansatzbirne 0,2 mg Chlorin in 0,2 ccm m/10 Phosphat, durch die berechnete Menge n/10 NaOH in Lösung gebracht. Temperatur 20°. Bei t_0 Chlorin in den Hauptraum und belichtet. Die eingestrahlte Intensität des roten Lichts betrug 5 cmm Quanten pro Minute, absorbiert wurden 2,23 cmm pro Minute.

Der Einfluß des Sauerstoffdrucks, der Konzentrationen des Thioharnstoffs und des Chlorins c_{Thio} und $c_{Farbstoff}$, sowie die Quantenausbeuten wurden sehr ähnlich gefunden, wie im Falle des Chlorophyllins. Zum Beispiel fanden wir:

c_{Thio}	$c_{Farbstoff}$	$\frac{c_{Thio}}{c_{Farbstoff}}$	J_{rot} eingestrahlt	J_{rot} absorbiert	$\frac{1}{\varphi}$
Mikromole/cm³ ⟶			cmm Quanten/Minuten		$\frac{h \cdot v}{O_2}$
500	0,286	1 750	10	9,6	*4,75*
500	0,190	2 630	25	16,9	*3,53*
500	0,047	10 700	5	2,23	*1,8*
500	0,012	42 000	26	2,8	*2,1*

Wie bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyllin fanden wir also auch hier, daß der Quantenbedarf *ab*nimmt, wenn das Verhältnis Thioharnstoff : Farbstoff *zu*nimmt, bis der Quantenbedarf 2 Mikromole Quanten pro Mikromol übertragenen Sauerstoffs beträgt. Bei beiden Sauerstoffübertragungen — durch Chlorophyllin oder durch Chlorin — war der Grenzwert des Quantenbedarfs 2 erreicht wenn $\frac{c_{Thio}}{c_{Chloro}}$ größer als 10000 war.

5. Chlorin + Thioharnstoff

(Variation des Sauerstoffdrucks)

Abb. 5 zeigt einen Versuch, bei dem belichtetes Chlorin Sauerstoff auf Thioharnstoff übertrug, während der Gasraum Luft oder 1 Vol.-% Sauerstoff in Argon enthielt. Wie der Versuch zeigt, war der Einfluß des Sauerstoffs auf die Geschwindigkeit der Sauerstoffübertragung geringfügig.

Im Hauptraum eines Manometriegefäßes befanden sich 100 Mikromole Thioharnstoff, gelöst in 3 ccm m/10 Phosphat pH 6,8. Die Ansatzbirne enthielt 0,1 Mikromol Chlorin e, gelöst in 0,2 ccm derselben Phosphatlösung und war durch die äquivalente Menge an NaOH in Lösung gebracht worden. Der Gasraum enthielt Luft oder 1,0 Vol.-% O_2 in Argon. Bei t_0 wurde das Chlorin in den Hauptraum gegeben und mit J = 100 ccm Quanten weißen Lichts pro Minute belichtet.

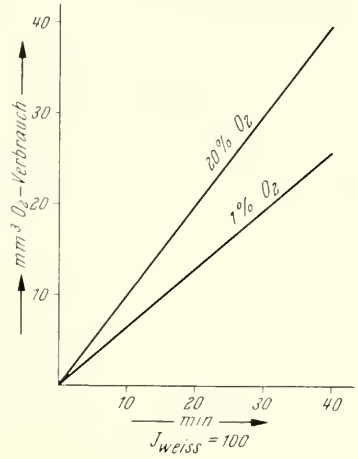
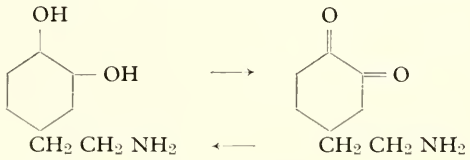


Abb. 5. Einfluß des Sauerstoffdrucks auf die Sauerstoffübertragung von belichtetem Chlorin auf Thioharnstoff.

6. Chlorin + Hydroxy-Tyramin als Akzeptor

Hydroxy-Tyramin wirkt in der Oxydationskette katalytisch durch den Wechsel



Da das physiologische pH 6,8 ist, so muß Hydroxy-Tyramin in der Kette bei pH 6,8 schnell oxydiert werden. Wir fanden jedoch, daß Hydroxy-Tyramin in Phosphatlösungen bei pH 6,8 praktisch nicht autoxydabel ist, weder im Dunkeln, noch im Licht; daß es aber schnell oxydiert wird, wenn man Chlorophyllin oder Chlorin zusetzt und belichtet. Wir fanden ferner, daß bei dieser Sauerstoffübertragung durch belichtete Chlorophyllderivate primär Wasserstoffperoxyd entsteht. Denn *während* der Sauerstoffübertragung zugesetzte Katalase vermindert den Sauerstoffverbrauch, *nach Ablauf* der Sauerstoffübertragung zugesetzte Katalase entwickelt die Summe des entstandenen Wasserstoffperoxyds. Abb. 6 ist die graphische Darstellung eines derartigen Versuchs, aus dem sich folgender Me-

chanismus der Sauerstoffübertragung ergibt, wenn man das belichtete Chlorin mit einem Stern markiert:

$$O_2 + \text{Chlorin}^* \rightleftharpoons \text{Chlorin}^*\text{-Peroxyd}$$

$$\text{Chlorin}^*\text{-Peroxyd} + \text{Hydroxy-Tyramin} = \text{Chlorin} + \text{Orthochinon} + H_2O_2$$

Im Hauptraum von 2 Manometriegefäßen je 3,5 ccm m/20 Phosphat pH 6,8 + 0,5 Mikromole Chlorin e (= 0,3 mg des krystallisierten Präparats) + 10 Mikromole Hydroxy-Tyramin (= 2 mg des krystallisierten Präparates). Gasraum Luft. Temperatur 20°. Jede Ansatzbirne enthielt 100 γ Katalase-Böhringer. Im Dunkeln wurde kein Sauerstoffverbrauch gefunden. Bei t_0 wurde mit der Belichtung begonnen und 800 cmm Quanten weißes Licht pro Minute eingestrahlt. Gleichzeitig wurde in Gefäß I die Katalase in den Hauptraum gegeben, während in Gefäß II die Katalase erst nach 180 Minuten in den Hauptraum gegeben wurde. Die erhaltenen Sauerstoffwerte waren:

In Gefäß I in 180 Minuten 10,7 μM O_2 *absorbiert.*
In Gefäß II in 180 Minuten 14,3 μM O_2 *absorbiert.*
In Gefäß II beim Einkippen
der Katalase 3,4 μ O_2 *entwickelt.*

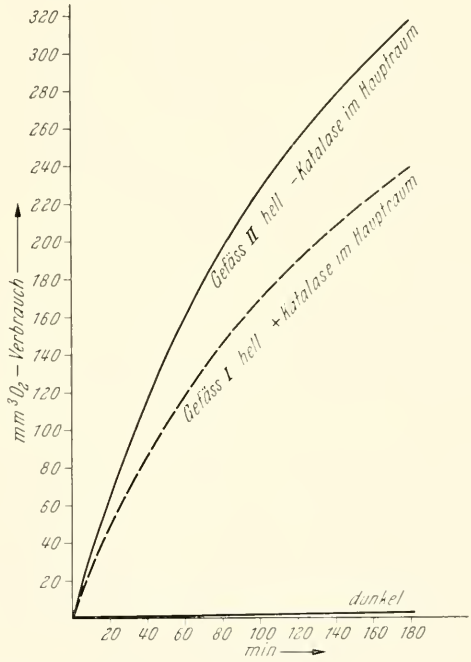


Abb. 6. Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorin auf Hydroxy-Tyramin.

7. Chlorophyllin + Hydrochinon als Akzeptor

Hydrochinon als Akzeptor bei der Sauerstoffübertragung hat den Vorzug vor Tyramin, daß das Oxydationsprodukt para-Benzochinon ist, das beständiger ist als das aus Hydroxy-Tyramin entstehende Ortho-Chinon. Als Katalysator benutzten wir hier Chlorophyllin Merck.

Hydrochinon, gelöst in Phosphatlösung pH 6,8 war bei der angewandten Konzentration praktisch nicht autoxydabel*, weder im Dunkeln noch im Licht, wurde

* Geht man mit der Hydrochinon-Konzentration von n/100 auf n/10, so stört beipH 6,8 die Autoxydation des Hydrochinons die Untersuchung der Sauerübertragung durch Chlorophyllin. pH 6 jedoch hemmt die Autoxydation des Hydrochinons sehr stark, ohne die Sauerstoffübertragung durch das Chlorophyllin wesentlich zu hemmen.

aber schnell oxydiert, wenn eine katalytische Menge Chlorophyllin zugesetzt und belichtet wurde. In diesem Fall war die Bildung an Wasserstoffperoxyd quantitativ, d. h. es entstand 1 Mikromol H_2O_2, wenn 1 Mikromol O_2 verbraucht wurde. Katalase, während der Sauerstoffübertragung zugesetzt, vermindert also den Sauerstoffverbrauch auf die Hälfte, und Katalase, nach Beendigung des Versuchs zugesetzt, ergab die aus dem Sauerstoffverbrauch berechnete Menge H_2O_2. Der Versuch ist in Abb. 7 graphisch dargestellt und ergibt die Reaktionsgleichungen

$$O_2 + \text{Chlorophyllin}^* = \text{Chlorophyllin}^*\text{-Peroxyd}$$
$$\text{Chlorophyllin}^*\text{-Peroxyd} + \text{Hydrochinon} = \text{Chlorophyllin} + H_2O_2 + \text{Chinon}$$

wo die Markierung mit dem Stern Belichtung bedeutet.

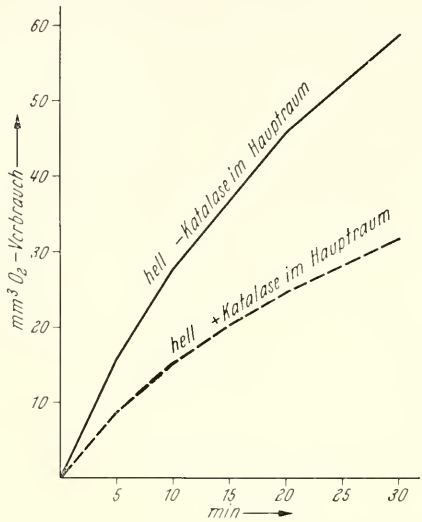


Abb. 7. Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyllin auf Hydrochinon.

Im Hauptraum von 2 Manometriegefäßen je 3,5 cm³ m/20 Phosphat pH 6,8 + 0,5 Mikromole Chlorophyllin (0,3 mg Präparat von E. Merck) + 20 Mikromole Hydrochinon. Gasraum Luft. Temperatur 20°. Birne je 100 g Katalase (C. F. Böhringer). Im Dunkeln keine Reaktion. Bei t_0 800 cmm Quanten weißes Licht pro Minute eingestrahlt. Bei t_0 in Gefäß I Katalase in den Hauptraum. Nach 180 Minuten in Gefäß II Katalase in den Hauptraum.

Die erhaltenen Werte waren nach 30 Minuten Belichtung:

Gefäß I	(Katalase im Hauptraum von t_0 bis t = 30 Minuten)
	1,43 Mikromole O_2 absorbiert
Gefäß II	(ohne Katalase im Hauptraum)
	2,62 Mikromole absorbiert, Differenz 1,19 Mikromole O_2
Gefäß II	(nach Einkippen der Katalase bei t = 30 Minuten)
	1,0 Mikromole O_2 entwickelt aequivalent 2 Mikromol H_2O_2.

8. Chlorin + Ascorbinsäure als Akzeptor

In Abb. 8 ist ein Versuch mit Ascorbinsäure als Akzeptor graphisch dargestellt. Durch Zusatz von Katalase während der Sauerstoffübertragung ist auch hier die Entstehung des H_2O_2 bewiesen worden.

Im Hauptraum von 2 Manometriegefäßen je 3,5 cm³ m/20 Phosphat pH 6,8 + 0,05 Mikromole Chlorin + 20 Mikromole Na-ascorbat. Gasraum Luft. Temperatur 20°. Birne von Gefäß I 100 g Katalase (Böhringer). Im Dunkeln keine Reaktion. Bei t_0 800 cmm Quanten weißes Licht pro Minute eingestrahlt. Bei t_0 in Gefäß I Katalase in den Hauptraum.

Die erhaltenen Werte waren nach 12,5 Minuten Belichtung:

Gefäß I (Katalase im Hauptraum von t_0 bis t = 12,5 Minuten)
6,48 Mikromole O_2 absorbiert.

Gefäß II (ohne Katalase im Hauptraum)
11,57 Mikromole O_2 absorbiert, Differenz 5,09 Mikromole O_2.

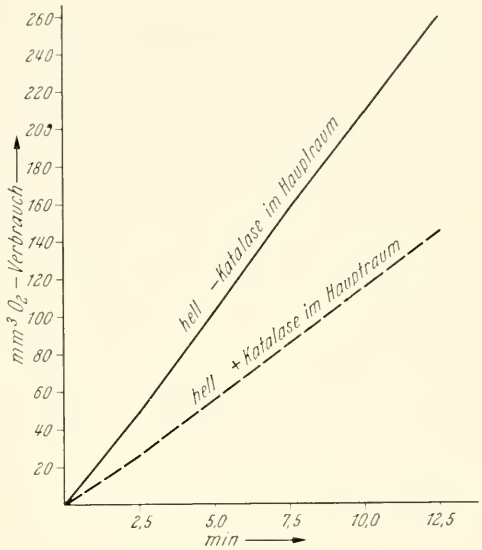


Abb. 8. Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorin auf Ascorbinsäure.

Literatur

1 Warburg, O., und Schocken, V., Archives of Biochemistry 21 (1949), 363.

2 Moureu, Ch., und Dufraisse, Ch., Comptes Rend. 182 (1926), 1440, 1584.

3 Windaus, A., und Brunken, J., Liebigs Ann. 460 (1928), 227.

4 Willstaetter, R., und Stoll, A., Untersuchungen über Chlorophyll. Verlag Springer, Berlin 1913.

5 Warburg, O., in Gaffron, H., Chem. Berichte 60 (1927), 755.

6 Fischer, H., und Orth, H., Die Chemie des Pyrrols, II, 2, S. 91 (Leipzig 1940).

85 Wasserstoffperoxyd in Chlorella*

Von Otto Warburg und Günther Krippahl

Wenn bei den Chinonreaktionen in grünen Grana[1]

$$2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \qquad [I]$$

das gebildete Hydrochinon immer wieder zurückoxydiert wird und wenn dabei die Katalase durch Blausäure gehemmt wird, so wird die Gleichung der Reoxydation

$$2\ \text{Hydrochinon} + 2\ O_2 = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O_2 \qquad [II]$$

Addiert man die beiden Gleichungen, so fällt das Chinon aus der Bilanz heraus, und man erhält die Bilanzreaktion[2]

$$2\ H_2O + O_2 = 2\ H_2O_2 \qquad [III]$$

also in der Bilanz keine *Entwicklung* von Sauerstoff, sondern einen Verbrauch von Sauerstoff und außerdem Wasserstoffperoxyd, und zwar doppelt soviel Wasserstoffperoxyd, als Sauerstoff verbraucht worden ist. Während bei einer gewöhnlichen Autoxydation der Quotient $\frac{H_2O_2}{O_2} = 1$ ist, findet man hier $\frac{H_2O_2}{O_2} = 2$, weil immer 1 Molekül Sauerstoff entwickelt wird, wenn 2 Moleküle Chinon reduziert werden, gemäß der hundertfach bestätigten empirischen Gleichung (I).

Es war eine der wichtigsten Entdeckungen[2] der letzten Jahre auf dem Gebiet der Photosynthese, daß man die Bilanzreaktion (III) findet, wenn man die Katalase der Chlorella durch Blausäure hemmt und dann *ohne Zusatz eines Chinons oder eines andern Oxydans* belichtet; folgte doch daraus, daß grüne Zellen ein Oxydans von der Wirkungsart des Chinons enthalten, das im Licht Sauerstoff entwickelt.

Im folgenden werden weitere quantitative Versuche über die Wasserstoffperoxydbildung in belichteter Chlorella mitgeteilt, insbesondere ist der zeitliche Verlauf der Reaktion und der Einfluß der Kohlensäure auf die Reaktion untersucht worden. Die experimentellen Bedingungen waren wie früher ein Sauerstoffdruck von 1 Atmosphäre, eine Blausäurekonzentration von $^1/_{100}$ normal, und starke Belichtung. Im Dunkeln bildet sich *kein* Wasserstoffperoxyd. Es ist methodisch wichtig, daß das Wasserstoffperoxyd, das sich im Licht bei gehemmter Katalase bildet, sehr schnell die Atmung der Chlorella zerstört und die Chlorella dadurch in einen ähnlichen Zustand umwandelt, in dem sich die grünen Grana

---

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

Zusatz 1961. H_2O_2-Bildung in belichteten grünen Zellen ist 1925 von Warburg und Tanaka entdeckt worden (Biochem Z. *157*, 425. 1925). 26 Jahre später bestätigte A. H. Mehler die H_2O_2-Bildung im Licht (Archives Biochem. *33*, 65. *34*, 339. 1951) ohne unsere Versuche zu zitieren. Die „Mehler-Reaktion", wie sie seitdem in Chicago genannt wurde, wurde dort auf der Basis der Wasserphotolyse, also durchaus unrichtig, erklärt.

befinden, die bekanntlich keine wesentliche Atmung besitzen. Auch in den Grana findet man die Wasserstoffperoxydbildung mit dem Quotienten $\frac{H_2O_2}{O_2} = 2$, unter ähnlichen, jedoch nicht identischen Bedingungen wie bei Chlorella.

Abb. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion (III) für den Fall, daß dem Sauerstoff 20 Vol.-% Kohlensäure zugesetzt waren. Der zur Zeit t verbrauchte Sauerstoff ist nach unten, das gebildete Wasserstoffperoxyd ist nach oben aufgetragen, wobei 1 Mikromol H_2O_2 gleich 22,4 cmm H_2O_2 gesetzt worden ist. Dividiert man $\frac{dc}{dt}$ der oberen Kurve durch $\frac{dc}{dt}$ der unteren Kurve für verschiedene Zeiten t, so erhält man die Quotienten $\frac{H_2O_2}{O_2}$ für die Zeiten t, zum Beispiel:

t (Minuten)	$\frac{H_2O_2}{O_2}$
30′	2,75
60′	1,91
120′	1,39
210′	1,15

Das Ergebnis ist also, daß der Quotient $\frac{H_2O_2}{O_2}$ in der ersten Stunde im Mittel nahezu 2 ist, daß er dann kleiner wird und nach etwa 5 Stunden den Wert 1 erreicht. Die *Entwicklung* von Sauerstoff aus dem Photolyten wird also dauernd kleiner, an die Stelle der Oxydation des Photolyten werden andere Substrate oxydiert.

30 cmm Chlorella (A-Zellen), suspendiert in 3 ccm m/50 Phosphat pH 3,8 im Hauptraum von Wannengefäßen, im Gasraum 20 Vol.-% CO_2—O_2. n/100 Blausäure wurde nach GEWITZ und VÖLKER[3] in den Wannen aus $Hg(CN)_2$ entwickelt. Temperatur 20°. 800 cmm Quanten weißes Licht pro Minute eingestrahlt. — X_{O_2} wurde aus den Druckänderungen h durch Multiplikation mit k_{O_2} berechnet, da nach kurzer Belichtung in n/100 H CN die Atmung bereits Null geworden ist. — Zur Bestimmung des H_2O_2 wurden die Zellen zu den Zeiten t abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit H_2SO_4 angesäuert und in Manometriegefäße eingefüllt, die in den Wannen Kalilauge enthielten. War mit Luft die Hauptmenge der H CN ausgetrieben, so wurden 0,2 ccm n/1 K MnO_4 aus einer Birne in den Hauptraum gegeben, wobei der O_2 des H_2O_2 entwickelt wurde und die Blausäurereste nicht störten, da sie unter den Versuchsbedingungen mit K MnO_4 nicht reagierten; und wobei etwa entstehende CO_2 durch die KOH in den Wannen absorbiert wurde. Würde man das H_2O_2 hier mit Katalase bestimmen, so müßte die Blausäure vorher vollständig aus dem Überstand der Zellen ausgetrieben werden.

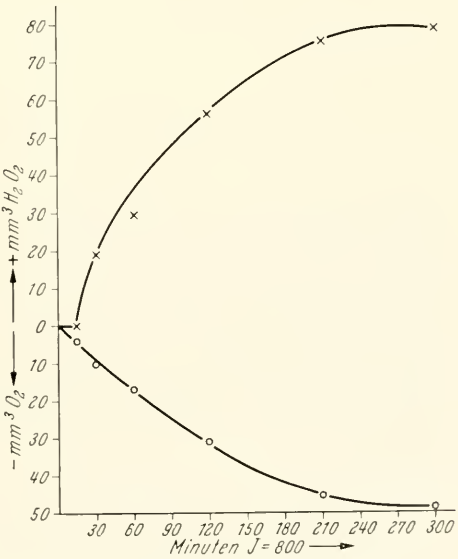


Abb. 1. Wasserstoffperoxydbildung in 20 Vol.-% CO_2 — O_2.

Abb. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion (III) für den Fall, daß dem Sauerstoff keine Kohlensäure zugesetzt war. Dividiert man $\frac{dc}{dt}$ der oberen Kurve durch $\frac{dc}{dt}$ der unteren Kurve zu verschiedenen Zeiten t, so erhält man die Quotienten $\frac{H_2O_2}{O_2}$ für die Zeiten t, zum Beispiel:

t (Minuten)	$\frac{H_2O_2}{O_2}$
30′	1,20
60′	1,10
120′	0,88
210′	0,63

Das Ergebnis ist, daß in Sauerstoff ohne Zusatz von Kohlensäure der Quotient $\frac{H_2O_2}{O_2}$ von Anfang an in der Nähe von 1 liegt, also einer gewöhnlichen Autoxydation entspricht; und daß dieser Quotient im Verlauf von Stunden unter 1 absinkt, was einen Verbrauch des bei der Autoxydation gebildeten H_2O_2 anzeigt. Eine wesent-

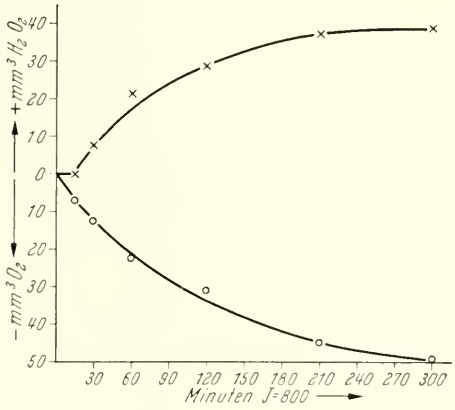


Abb. 2. Wasserstoffperoxydbildung im Sauerstoff ohne Zusatz von Kohlensäure.

liche *Entwicklung* von Sauerstoff wird also nicht gefunden, wenn dem Sauerstoff keine Kohlensäure zugesetzt wird. Die grünen Grana verhalten sich in dieser Beziehung anders, sie entwickeln H_2O_2 mit dem Quotienten $\frac{H_2O_2}{O_2} = 2$ auch in Luft und auch dann, wenn der Luft keine Kohlensäure zugesetzt wird. Wie bei ungehemmter Katalase, so scheint auch bei gehemmter Katalase in den Grana eine katalytische Menge Kohlensäure[3] zur Entwicklung des Sauerstoffs zu genügen.

Alles wie in dem Versuch der Abb. 1, jedoch ohne Zusatz von Kohlensäure zu dem Sauerstoff.

Literatur

1 Warburg, O., und Lüttgens, W., Naturwissenschaften 32 (1944), 161, 301.
2 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 14b (1959), 712.
3 Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 625.
4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960) 367.

86 Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure bei Chlorella*

Von Otto Warburg, Günther Krippahl und Klaus Jetschmann

Verschiebt man in lebender Chlorella pH von 6,8 auf etwa 6,5, indem man der Kulturlösung eine permeierende Säure hinzufügt, z. B. n/1000 Fluorwasserstoffsäure, so zerfällt die Glutaminsäure fermentativ im Dunkeln, unter anaeroben Bedingungen, in γ-Aminobuttersäure und Kohlensäure. Ist dabei die Fluoridkonzentration nicht zu hoch, so verhindert Sauerstoff den Zerfall, da bei Gegenwart von Sauerstoff der Wiederaufbau durch die Energie der Atmung (die in verdünntem Fluorid steigt[1]), dem Zerfall der Glutaminsäure die Waage hält. Ist aber die Glutaminsäure anaerob bereits zerfallen, so kann sie aerob wieder aufgebaut werden, wenn man in Luft unter Zugabe von Kohlensäure belichtet. So kann man *in lebender Chlorella* Glutaminsäure in kurzen Zeiten entstehen lassen und wieder zum Verschwinden bringen und mit Hilfe dieser Reaktionen beweisen, daß die Glutaminsäure ein integrierender Bestandteil des Mechanismus der Photosynthese ist. Denn die Fähigkeit zur Photosythese verschwindet, wenn die Glutaminsäure zerfällt und kehrt mit dem Wiederaufbau der Glutaminsäure zurück.

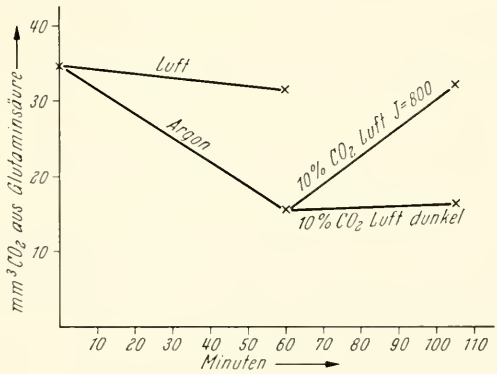


Abb. 1. Anaerober Zerfall und aerober Wiederaufbau der Glutaminsäure in n/1000 Fluorid.

Abb. 1 veranschaulicht den Zerfall und den Wiederaufbau der Glutaminsäure durch einen manometrischen Versuch mit Kegelgefäßen, die zwei Ansatzbirnen tragen. Aus Birne I wurde zur Zeit t_0 zu den Zellen im Hauptraum Fluorid bis zur Konzentration n/1000 hinzugefügt und dadurch das für den Zerfall notwendige pH in den Zellen hergestellt. Später, nachdem das n/1000 Fluorid eingewirkt hatte, wurde aus Birne II Fluorid bis zur Konzentration n/80 zu den Zellen in den Hauptraum gegeben und dadurch die zur Zeit t noch vorhandene Glutaminsäure vollständig zersetzt, so daß die nunmehr entwickelte Kohlensäure gleich dem Glutaminsäuregehalt zur Zeit t war.

100 cmm Chlorella (A-Zellen) = 1,22 Mikromole Chlorophyll, suspendiert in 3 ccm Kulturlösung, die auf pH 3,8 angesäuert war, im Hauptraum eines Kegels mit 2 Birnen. In Birne I 0,2 ccm 0,016 molar NaF, angesäuert auf pH 3,8. In Birne II 0,2 ccm 0,2 molar NaF, angesäuert

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

auf pH 3,8. Im Gasraum Luft oder Argon oder 10 Vol.-% CO_2-Luft. Temperatur 20°. Zur Zeit t_0 Fluorid aus Birne I in den Hauptraum, zu den Zeiten t Fluorid aus Birne II in den Hauptraum. — J = 800 bedeutet, daß in das Kegelgefäß pro Minute 800 cmm Quanten weißes Licht eingestrahlt wurden. — Zum Zweck des Wiederaufbaus der Glutaminsäure wurde das n/1000 Fluorid aus den Zellen *nicht* fortgewaschen, der Wiederaufbau vollzog sich also in n/1000 Fluorid. — Die zum Wiederaufbau angewandten CO_2-Drucke von 10 Vol.-% wurden *vor* der Glutaminsäurebestimmung (vor Einkippen der Birne II) durch Luft entfernt, um Bikarbonat und „aerobe" CO_2 auszutreiben.

Abb. 2 zeigt, daß Licht den anaeroben Zerfall der Glutaminsäure verhindert. Die Ursache ist, daß Licht in den Zellen Sauerstoff entwickelt und dadurch eine Atmung unterhält, die man zwar manometrisch nicht sehen kann, die aber genügt, um die zum Wiederaufbau der Glutaminsäure notwendige Phosphatenergie zu

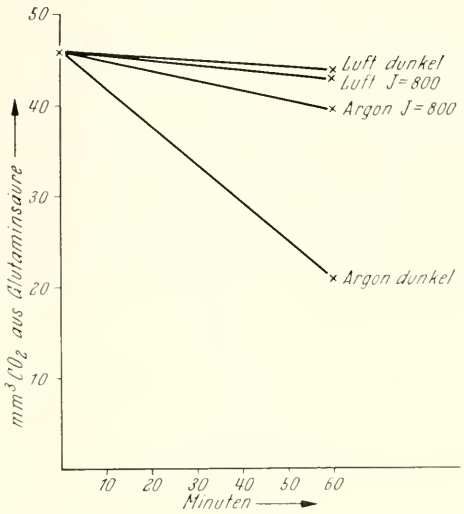


Abb. 2. Wirkung des Lichts auf den anaeroben Zerfall der Glutaminsäure in n/1000 Fluorid.

liefern. Wie bei der Phosphorylierung in den belichteten grünen Grana spielt das Licht hierbei nur die Rolle, daß es den zur fortgesetzten Dehydrierung notwendigen Sauerstoff liefert.

100 cmm Chlorella = 1,73 Mikromole Chlorophyll, suspendiert in 3 ccm Kulturlösung, die auf pH 3,8 angesäuert war. Im übrigen Anordnung wie in Versuch der Abb. 1.

Es ist bemerkenswert, wie ähnlich sich der Zerfall der Glutaminsäure und der Zerfall der aeroben Kohlensäure in Chlorella verhalten. Beide, die Glutaminsäure und die aerobe Kohlensäure[2], zerfallen bei Entziehung des Sauerstoffs und werden bei Zugabe von Sauerstoff wieder aufgebaut und unterscheiden sich in ihren Zerfalls- und Aufbaureaktionen nur durch einen geringfügigen Unterschied der pH-Bedingung. Da nun für den Wiederaufbau der aeroben Kohlensäure die Phosphorylierung als notwendig bewiesen worden ist[2], so wird man nunmehr die Phosphorylierung auch für den Wiederaufbau der Glutaminsäure als notwendig annehmen müssen.

Anmerkung. Neuere Beobachtungen haben gelehrt, daß aus Kulturlösung, die auf pH 3,8 angesäuert ist, in längeren Zeiten so viel Salpetersäure in die Zellen diffundiert, daß Glutaminsäure zersetzt wird. Wir waschen deshalb die Zellen in nicht angesäuerter Kulturlösung, deren pH 4,3 ist, und säuern erst kurz vor Beginn der Versuche auf pH 3,8 an; oder wir ersetzen das Nitrat der Kulturlösung durch NH_4Cl.

Abb. 3 zeigt, daß n/100 Phenanthrolin die aerobe Resynthese der Glutaminsäure verhindert. Die Ursache ist, daß Phenanthrolin zwar nicht die Ruheatmung der Chlorella, aber die durch Fluorid induzierte Atmung hemmt. Wie bereits in unsrer ersten Arbeit über die Glutaminsäure mitgeteilt[1], bewirkt n/1000 Fluorid eine erhebliche, mit der Resynthese zusammenhängende Zunahme der Atmung. Diese Zunahme findet man *nicht*, wenn man dem n/1000 Fluorid n/100 Ortho-

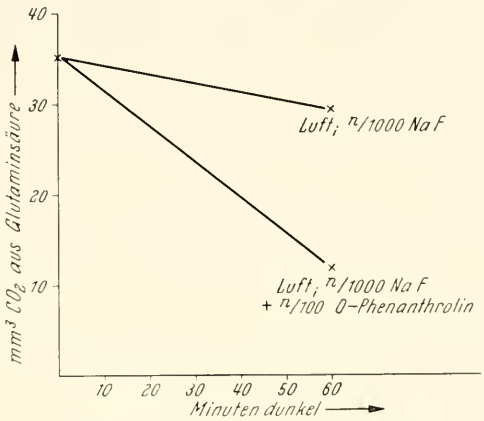


Abb. 3.
Wirkung von Ortho-Phenanthrolin auf den aeroben Wiederaufbau der Glutaminsäure.

Phenanthrolin zufügt. Zum Beispiel fanden wir manometrisch, wenn 100 cmm Chlorella (A-Zellen) in Salzlösung S pH 3,8 suspendiert und mit Luft gesättigt wurden, bei 20°:

Ruheatmung (ohne Fluorid)

ohne Phenanthrolin	in 45′	X_{O_2}	— 29,6 cmm
		X_{CO_2}	+ 27,2 cmm
+ n/100 Phenanthrolin	in 45′	X_{O_2}	— 33,2 cmm
		X_{CO_2}	+ 32,6 cmm

Induzierte Atmung + Ruheatmung in n/1000 Fluorid

ohne Phenanthrolin	in 45′	X_{O_2}	— 65,2 cmm
		X_{CO_2}	+ 56,6 cmm
+ n/100 Phenanthrolin	in 45′	X_{O_2}	— 38,4 cmm
		X_{CO_2}	+ 36,8 cmm

Die Resynthese der Glutaminsäure verhält sich also wie eine ATP-verbrauchende Reaktion, bei der das ATP durch die Atmung geliefert und die Größe der Atmung durch den Verbrauch an ATP gesteuert wird.

100 cmm Chlorella (A-Zellen) in 3 ccm Salzlösung pH 3,8 suspendiert + n/1000 Fluorid ± n/100 Phenanthrolin. Temperatur 20°. Gasraum Luft. Im übrigen Anordnung wie im Versuch der Abb. 1.

Literatur

1 Vgl. Warburg, O., Klotzsch, H., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 12b (1957), 622 (S. 626); und dieses Buch, S. 388.

2 Warburg, O., und Krippahl, G., über den Photolyten der Photosynthese. Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 788.

87 Hemmung der Phosphorylierung durch Phenanthrolin in lebender Chlorella*

Von Otto Warburg und Klaus Jetschmann

In dieser Arbeit zeigen wir, daß man Ortho-Phenanthrolin, das die Schwermetallkatalyse der Photosynthese reversibel hemmt[1], auch benutzen kann, um die magnesium-katalysierten Phosphorylierungen in lebender Chlorella zu hemmen: die Resynthese der Glutaminsäure, die Synthese der aeroben Kohlensäure und die Synthese des Photolyten. Zwar bindet Phenanthrolin Magnesiumsalze lockerer als Schwermetallsalze, aber doch so fest, daß größere Phenanthrolinkonzentrationen die Phosphorylierungen hemmen. Variiert man dabei die Konzentration des Phenanthrolins, so kann man in lebender Chlorella neben der Schwermetallkatalyse die Phosphorylierungen nachweisen.

Phenanthrolin-Hemmung der Phosphatübertragung in Fermentlösungen

Die Hemmung der Phosphatübertragung durch Phenanthrolin wird am besten mit Hilfe des Tests demonstriert, mit dem wir das phosphatübertragende Ferment der

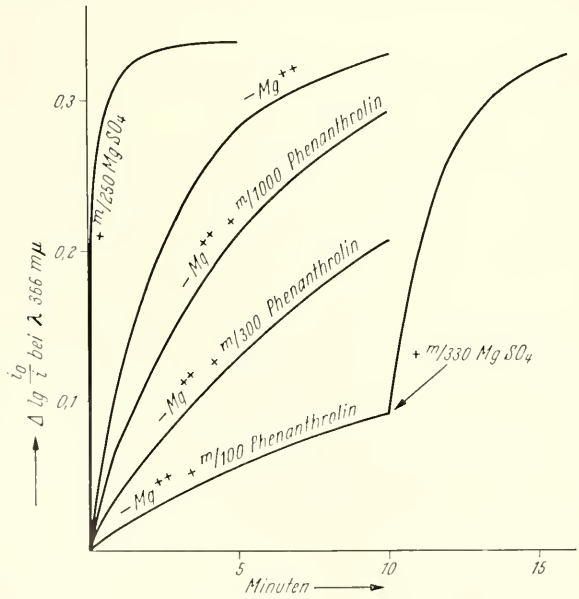


Abb. 1. Wirkung von Phenanthrolin auf die Magnesium-Katalyse bei der Phosphatübertragung.

Gärung isoliert haben[2]. Die Testreaktion ist also die Phosphorylierung der 3-Phosphoglycerinsäure zur 1,3-Phosphoglycerinsäure durch ATP und die darauffolgende Hydrierung der 1,3-Phosphoglycerinsäure durch hydriertes Nikotin-

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

säureamid zu Triosephosphat. Da Phenanthrolin die Wellenlänge 340 mμ zu stark absorbiert, mißt man den Ablauf der Reaktion bei 366 mμ.

Abb. 1 ist die graphische Darstellung eines Versuches. m/100 Phenanthrolin hemmt die Phosphorylierung *nicht*, wenn man der Testlösung viel Magnesiumsalz zusetzt. m/100 Phenanthrolin hemmt die Phosphorylierung sehr stark, wenn man kein Magnesiumsalz zusetzt, sondern sich mit der katalytischen Wirkung der kleinen Mengen an Magnesiumsalzen (oder Mangansalzen) begnügt, die die Testlösungen als Verunreinigung enthalten. Durch Zusatz einer größeren Menge Magnesiumsalz zu dem gehemmten Fermentsystem kann man dann zeigen, daß die Phenanthrolinhemmung der Phosphorylierung vollständig reversibel ist und bedingt ist durch den Mangel an katalysierendem Metall.

Reagenzien nach Böhringer Biochimica, Enzymatische Bestimmung von ATP. Temperatur 20°. Wellenlänge 366 mμ.

„Minus Mg" bedeutet Böhringer-Reagenzien *ohne* Mg-Zusatz. Bei t_0 wurden das oxydierende und das phosphatübertragende Ferment zugegeben, bei t = 10 Minuten wurde die hemmende Wirkung des n/100 Phenanthrolins durch Magnesiumzusatz vollständig aufgehoben.

Anwendungen auf die Photosynthese

1. Resynthese der Glutaminsäure. m/1000 Fluorid, zu einer Suspension lebender Chlorella zugesetzt, bewirkt unter anaeroben Bedingungen, daß die Glutaminsäure schnell zu γ-Aminobuttersäure und Kohlensäure zerfällt; während aerob der Zerfall der Glutaminsäure weitgehend durch die Resynthese der Glutaminsäure kompensiert wird.

Bei der Resynthese der Glutaminsäure steigt die Atmung der Chlorella auf das Doppelte. m/100 Phenanthrolin hemmt diesen Anstieg der Atmung und gleichzeitig die Resynthese der Glutaminsäure vollständig[3]. Wenn nun hier, wie bei der Phosphorylierung der Phosphoglycerinsäure, m/100 Phenanthrolin die Phosphorylierung hemmt, so versteht man, warum in m/100 Phenanthrolin die Atmungssteigerung durch Fluorid und damit die Resynthese der Glutaminsäure ausbleibt.

2. Synthese der aeroben Kohlensäure. Wie die Resynthese der Glutaminsäure, so kann man in lebender Chlorella auch die Synthese der aeroben Kohlensäure durch m/100 Phenanthrolin vollständig hemmen. Zum Beispiel wurden 100 cmm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Salzlösung S pH 3,8 in den Hauptraum von Manometriegefäßen gegeben, 30 Minuten mit 20 Vol.-% CO_2-Luft bei 20° im Dunkeln geschüttelt, ohne Phenanthrolin oder in m/100 Phenanthrolin. Dann wurde aus der Birne 0,2 m/5 Fluorid pH 3,8 zugegeben und dadurch die Kohlensäure entwickelt. Wir fanden:

	ohne Phenanthrolin	in m/100 Phenanthrolin	Anaerober Wert ± Phenanthrolin
Gesamt-CO_2	+ 91,8 cmm CO_2 — 61,5 cmm CO_2	+ 61,5 cmm CO_2 — 61,5 cmm CO_2	+ 61,5 cmm CO_2
Aerobe CO_2 gebildet	+ 30,3 cmm CO_2	0 cmm CO_2	

Auch die Synthese der aeroben Kohlensäure wird also durch m/100 Phenanthrolin vollständig gehemmt. Wenn nun hier, wie bei der Phosphorylierung der Phosphorglycerinsäure, m/100 Phenanthrolin die Phosphorylierung hemmt, so versteht man, warum in m/100 Phenantrolin die Atmungssteigerung durch Kohlensäure und damit die Synthese der aeroben Kohlensäure ausbleibt. Übrigens war für diese Synthese die Beteiligung der Phosphorsäure bereits dadurch bewiesen[4], daß die Synthese ausbleibt, wenn man das Phosphat durch Arsenat ersetzt; und daß die Synthese wieder einsetzt, wenn man der Arsenatlösung Phosphat hinzufügt.

3. Konzentration des Photolyten im Licht. Häuft man den Photolyten in Chlorella bis zu seiner maximalen Konzentration an, indem man bei 20° 30 Minuten im Dunkeln mit 20 Vol.-% CO_2-Luft schüttelt, und belichtet man dann 15 Minuten stark, so wird der Photolyt unter Sauerstoffentwicklung zersetzt und seine Konzentration, die von Zersetzung und Nachbildung abhängt, sinkt auf einen niedrigen stationären Wert.

m/300 Phenanthrolin verhindert dieses Absinken der Photolytkonzentration, weil m/300 Phenanthrolin zwar das die Zersetzung katalysierende Eisen bindet, aber nicht genügt, um das die Phosphorylierung katalysierende Magnesium zu binden.

Wiederholt man den Versuch mit dem Unterschied, daß die Phenanthrolinkonzentration m/100 beträgt, so wird nicht nur das Eisen, sondern auch das Magnesium (oder Mangan) gebunden, es wird also nicht nur die *Zersetzung* des Photolyten, sondern auch die *Synthese* des Photolyten gehemmt, und man findet keine Anhäufung des Photolyten.

Zum Beispiel waren die stationären Konzentrationen des Photolyten, bestimmt mit m/80 Fluorid, in 100 cmm Chlorella, die mit 800 cmm Quanten pro Minute bei 20° belichtet wurde:

	Konzentration des Phenanthrolins		
	0	m/300	m/100
Photolyt, cmm CO_2	*0*	*31,5*	*3,5*

Literatur

1 Warburg, O., Heavy Metals and Enzyme Action. Clarendon Press. Oxford 1949.
2 Warburg, O., Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin 1948.
3 Vgl. dieses Buch, S. 611.
4 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 788.

88 Wirkung der Blausäure auf die Bildung des Photolyten der Photosynthese*

Von Otto Warburg und Klaus Jetschmann

Der Photolyt der Photosynthese, der in Chlorella normalen Chlorophyllgehalts bis zur Chlorophylläquivalenz angehäuft werden kann, entwickelt im Licht Sauerstoff, aber im Dunkeln beim Ansäuern die äquivalente Menge Kohlensäure und ist dadurch als Kohlensäureverbindung charakterisiert.

Die Synthese dieser Kohlensäureverbindung vollzieht sich in 2 Phasen. Zunächst wird die Kohlensäure in einer chemischen Dunkelreaktion gebunden. Es folgt dann, in einer zweiten Dunkelreaktion, die Umwandlung der gebundenen Kohlensäure in den Photolyten. Beide Reaktionen verlaufen nicht von selbst, sondern benötigen zu ihrem Ablauf der Energie der Atmung, also wahrscheinlich der Phosphorylierung, was für die erste Reaktion bewiesen ist. Für die erste Reaktion ist ferner bewiesen, daß Glutaminsäure ein Reaktionsteilnehmer ist. Läßt man die Glutaminsäure durch Zusatz von m/1000 Fluorid in lebender Chlorella zerfallen, so bleibt die Bindung der Kohlensäure aus. Läßt man die Glutaminsäure in den gleichen Zellen sich zurückbilden, so wird die Kohlensäure wieder chemisch gebunden. Da ferner in maximo fast ebensoviel Kohlensäure chemisch gebunden werden kann, als die Zellen Glutaminsäure enthalten, so muß die Glutaminsäure an der Bindung beteiligt sein. Wir ziehen in Erwägung, daß die Reaktionsgleichung ist:

$$\text{Carboxyphosphat} + \text{Glutaminsäure} \rightleftharpoons \text{Phosphat} + \text{Carboxy-Glutaminsäure}$$

Diese Carboxyglutaminsäure kann nicht die Siegfriedsche Carbaminsäure sein wegen der Mitwirkung der Atmung bei ihrer Bildung; noch kann sie eine substituierte Aminomalonsäure sein, da Herr Arnold Lehmann diese Säure synthetisiert und gefunden hat, daß sie ihre Kohlensäure viel langsamer abgibt, als die aerob gebundene Kohlensäure. Die Carboxylierung einer Carboxylgruppe der Glutaminsäure zu einem Säureanhydrid wird zur Zeit hier geprüft.

Weniger ist über die zweite Reaktion bekannt, die Umwandlung der aerob gebundenen Kohlensäure, der „aeroben Kohlensäure", in den Photolyten. Man kann diese Umwandlung zeitlich von der Bindung der aeroben Kohlensäure trennen[1], da die Umwandlung wesentlich langsamer verläuft als die Bindung der aeroben Kohlensäure. Der Test zur Erkennung des Photolyten neben der aeroben Kohlensäure ist die Sauerstoffentwicklung im Licht, während aerobe Kohlensäure + Photolyt bestimmt werden durch die Kohlensäureentwicklung im Dunkeln mit m/80 Fluorid. Mit Hilfe von Fluorid im Dunkeln und von Licht (ohne Fluorid) kann man zu jeder Zeit feststellen, welcher Bruchteil der aeroben Kohlensäure in Photolyt umgewandelt ist.

Mit diesen Testen haben wir geprüft, wie sich die Synthese der aeroben Kohlensäure und die Umwandlung in den Photolyten gegen Blausäure verhält. Dabei haben sich die neuen Universal-Manometriegefäße[1] bewährt, das sind kegelförmige Gefäße, die 3 seitliche Ansätze haben, eine siamesische Birne, eine mit

---

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

einer Wanne verbundene Birne und eine einfache Birne. Waren die Zellen in den Hauptraum gegeben und mit Luft gesättigt, so wurde zunächst in der siamesischen Birne nach GEWITZ und VÖLKER[2] aus $Hg(CN)_2$ so viel Blausäure entwickelt, daß die Konzentration der Blausäure im Hauptraum n/100 wurde. Dann wurde in der Wanne, unter zeitweisem Öffnen der Manometerhähne, so viel Kohlensäure aus Bikarbonat entwickelt, daß der Gasraum auf einen Kohlensäuregehalt von etwa 20 Vol.-% CO_2-Luft kam und somit die Bedingungen zur Synthese des Photolyten hergestellt waren. Nachdem 30 Minuten Zeit gelassen war zum vollständigen Ablauf der Synthese, wurden wie oben erläutert, die gesamte gebundene Kohlensäure mit Fluorid und der Photolyt (ohne Fluorid) mit Licht bestimmt.

Der Versuch wurde mit dem Unterschied wiederholt, daß die Blausäure nicht *vor* der Kohlensäure, sondern *30 Minuten nach* der Kohlensäure entwickelt wurde, so daß also in der Zeit der Synthesen keine Blausäure in den Zellen war; während im ersten Versuch von Anfang an, während der ganzen Zeit der Synthesen, n/100 Blausäure in den Zellen war.

Zum Beispiel enthielt der Hauptraum eines Universalgefäßes, dessen Volumen 22 ccm war, 100 cmm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Salzlösung S pH 3,8. Der Gasraum enthielt Luft. Die siamesische Birne enthielt in der einen Hälfte 0,2 ccm 5 n H_2SO_4 in 10% NaCl, in der andern Hälfte 0,3 ccm m/20 $Hg(CN)_2$. Die Wanne enthielt 0,2 ccm n H_2SO_4. Die mit der Wanne verbundene Birne enthielt 16 mg $NaHCO_3$. Die mit dem Hauptraum verbundene Birne enthielt 0,2 ccm m/5 Fluorid pH 3,8, oder im Falle des Lichttests nichts. Die Temperatur war 20°.

Wir fanden für 100 cmm Chlorella die folgenden CO_2- und O_2-Entwicklungen:

	CO_2-Entwicklung durch Fluorid cmm	O_2-Entwicklung durch Licht cmm
HCN entwickelt *vor* Herstellung des CO_2-Drucks von $^1/_5$ Atmosphäre	*36*	*0*
HCN entwickelt 30′ *nach* Herstellung des CO_2-Drucks von $^1/_5$ Atmosphäre	*36*	*20*

Das Ergebnis ist also, daß in n/100 Blausäure ebensoviel aerobe Kohlensäure gebunden wird wie bei Abwesenheit von Blausäure, daß also Blausäure die Bindung der aeroben Kohlensäure nicht hemmt; daß aber in n/100 Blausäure die Umwandlung der aeroben Kohlensäure in den Photolyten vollständig gehemmt wird, da Licht keinen Sauerstoff entwickelt, wenn die Blausäure *vor* der Herstellung des Kohlensäuredrucks entwickelt worden war. Wurde aber die Blausäure erst 30 Minuten *nach* Herstellung des Kohlensäuredrucks entwickelt, also nach der Synthese der aeroben Kohlensäure und des Photolyten, so entwickelte Licht Sauerstoff, ein Beweis, daß Blausäure die Entwicklung des Sauerstoffs aus dem Photolyten, der bereits vorhanden ist, nicht hemmt.

Was die Blausäurehemmung der gesamten Photosynthese anbetrifft, so ist nunmehr ein durch Blausäure hemmbarer chemischer Vorgang gefunden, von dem sicher ist, daß er ein Teilvorgang der Photosynthese ist; während andere durch Blausäure hemmbare Teilvorgänge der Photosynthese bisher nicht bekannt ge-

worden sind*, wobei besonders hervorzuheben ist, daß das Eisen, das die Sauerstoffentwicklung im Licht katalysiert — wie auch in dieser Arbeit wieder gezeigt —, *nicht* durch Blausäure gehemmt wird. Es ist also nunmehr durchaus möglich, daß die Umwandlung der aeroben Kohlensäure in den Photolyten der Angriffspunkt der Blausäure bei der Hemmung der gesamten Photosynthese ist.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., dieses Buch Seite 555.

2 Gewitz, H. S., und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 625 und Seite 553 dieses Buches.

* Es sei denn die Hemmung der Zersetzung des H_2O_2 durch Katalase.

89 Über die Messung der Atmung von Krebszellen mit einer 1-Gefäßmethode*

Von Otto Warburg und Karlfried Gawehn

Wie mehrfach hervorgehoben, wird die Messung der Atmung der Krebszellen mit der 2-Gefäß-Methode ungenau, weil hier eine kleine Atmung neben einer großen aeroben Gärung zu messen ist. Eine Messung der Atmung unter physiologischen Bedingungen mit einer 1-Gefäß-Methode war bisher nicht möglich, es sei denn, man war bereit, auf die physiologischen Bedingungen, wie Serum und Kohlensäuredruck zu verzichten und die Atmung in Salzlösungen beim Kohlensäuredruck Null, mit Kalilauge im Einsatz, zu bestimmen.

Alle diese Schwierigkeiten sind nunmehr behoben, seit wir gezeigt haben[1], daß man mit 3-molaren Carbonatgemischen die physiologisch notwendigen Kohlensäuredrucke erzeugen und konstant halten kann, so daß man überall, wo man früher Kalilauge zur Absorption der Kohlensäure benutzte, heute Carbonatgemische zur Absorption der Kohlensäure benutzen wird, die die Kohlensäure nur bis zu einem gewünschten Druck, den man wählen kann, absorbieren. Zusatz des Ferments Cartase erzeugt dabei die notwendige schnelle Einstellung der Kohlensäure-Gleichgewichte. Durch die Einführung der Anhänger*gefäße*[2] ist dieser Fortschritt der biologischen Manometrie nach der geometrischen Seite ausgebaut worden.

Im folgenden sind zwei Versuche mitgeteilt, bei denen die Atmung von Ascites-Krebszellen und von umgewandelten embryonalen Zellen mit der neuen 1-Gefäß-Methode gemessen wurde. Nimmt man nach der Atmungsmessung die Zellsuspensionen aus den Manometriegefäßen heraus und bestimmt im Überstand der Zelle die Milchsäure optisch[3], so ergibt der 1-Gefäß-Versuch einwandfrei sowohl Atmung als auch aerobe Gärung.

Protokolle

1. Ascites

Material: Ehrlich-Mäuseascites-Tumorzellen

Manometrie: 38°; Frequenz = 180/min

Hauptraum: 3,0 ccm Ascites in inaktiviertem Ascitesserum = 15 mg Zelltrockengewicht.
0,06 ccm 10%ige Glukoselösung = 6 mg

Anhänger: 3,0 ccm 3 m $KHCO_3$—K_2CO_3-Puffer (80:20) (entspricht 5% CO_2)
2 mg Cartase

$V = 40{,}16$ ccm; $V_F = 6{,}06$ ccm; $k_{O_2} = 3{,}0$ mm²

10′	— 5,5
20′	—11
30′	—16
40′	—20
50′	—25
60′	—30

$x_{O_2} = -90$ mm³; $Q_{O_2} = -6$

* Nicht an anderer Stelle erschienen.

2.

Material: 2-Tage-Zellen einer in-vitro-Kultur von trypsinisierten Hühnerembryonen.

Manometrie: 38^0; v = 180/min

Hauptraum: 3,0 ccm Zellsuspension von 2-Tage-Zellen in Nährmedium (Bicarb. wurde auf 400 mm^3 pro ccm ergänzt)
= 12,9 mg Zelltrockengewicht
0,06 ccm 10%ige Glukoselösung = 6 mg

Anhänger: wie unter 1. angegeben

$V = 42{,}32$ ccm; $V_F = 6{,}06$ ccm; $k_{O_2} = 3{,}2$ mm^2

10′	— 3,5
20′	— 6
30′	— 9
40′	—12
50′	—14
60′	—17

$x_{O_2} = -54{,}4$ mm^3; $Q_{O_2} = -4{,}2$.

Literatur

1 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschg. 15b (1960), 364.
Warburg, O., Geissler, A.-W., und Lorenz, S., Z. f. Naturforschg. 16b (1961), 283.

2 Hergestellt von Aminco Corporation, Silver Springs, Maryland vergl. Seite 378 und 578 dieses Buches.

3 Warburg, O., Gawehn, K., und Geissler, A.-W., Hoppe-Seyler, 320 (1960), 277.

Über Wachstumshemmung durch Röntgenstrahlen*

Von Otto Warburg und Detlev Kayser

Da Röntgenstrahlen die Gärung von Zellen durch das Wasserstoffperoxyd[1, 2] hemmen, das die Strahlen in den Zellsuspensionen erzeugen, so lag es nahe zu untersuchen, ob auch die wachstumshemmende Wirkung der Röntgenstrahlen eine Wirkung des von ihnen gebildeten Wasserstoffperoxyds ist. Wir haben gefunden, daß dies für die Wachstumshemmung von Milchsäurebakterien zu bejahen ist, während die Versuche über die Wachstumshemmung von Krebszellen noch nicht abgeschlossen sind. Es ist wesentlich bei allen derartigen Versuchen, daß die Röntgendosen im linearen Wirkungsbereich liegen und daß die Zellsuspensionen so dünn sind, daß die endogene Katalase der Zellen das von den Strahlen gebildete oder das zugesetzte Wasserstoffperoxyd nicht zersetzt.

Bestrahlt wurde im bewegten Röntgenaktinometer[3], in dem sich das Bestrahlungsgefäß vollständig im Strahlenkegel des Röntgenlichts befand (Gerät RT 100 der Firma Müller, Hamburg. 100 KV, 8 Milliampere, 1,7 mm Aluminiumfilter, Fokusabstand 9,5 cm). Die Strahlendosis, gemessen in den Bestrahlungsgefäßen im bewegten Röntgenaktinometer, betrug 2000 bis 5000 r, bei einer Dosisleistung von 1400 r pro Minute.

Das Wachstum und die Hemmung des Wachstums der Milchsäurebakterien wurde durch die Zunahme der Atmung im Verlauf von 7 Stunden gemessen.

Zur Bestimmung der strahlenäquivalenten H_2O_2-Konzentrationen wurden die Suspensionsflüssigkeiten — *ohne Zellen* — bestrahlt, wobei Metallspuren, die H_2O_2 zersetzen könnten, durch n/100 Versen gebunden wurden. Das bei der Bestrahlung gebildete H_2O_2 wurde mit Ortho-Dianisidin nach Aebi[4] optisch gemessen, wobei im Fall sehr kleiner H_2O_2-Konzentrationen der Lichtweg 5 cm betrug. Die Meß-Längenwelle war 436 mμ, der Lichtabsorptionskoeffizient des gebildeten Farbstoffs war $\beta_{436} = 18{,}5$ cm^2/Mikromole Farbstoff.

1. Milchsäurebakterien

Bacterium lactis aerogenes wurde in 0,2% d,l-Lithiumlaktat und Salzlösung nach Hinshelwood[5] suspendiert und in einer Zelldichte von 0,025 cmm Bakterien pro ccm bestrahlt. Betrug die Strahlendosis 5000 r, so betrug die Wachstumshemmung im Mittel 65%. Die 5000 r äquivalente Konzentration an H_2O_2, wie oben beschrieben gemessen, betrug 0,004 Mikromole H_2O_2 pro ccm also $4 \cdot 10^{-6}$ Mole H_2O_2 pro Liter. Diese sehr kleine H_2O_2-Konzentration, zu 0,025 cmm Bakterien zugesetzt, hemmte das Wachstum, *ohne Bestrahlung*, im Mittel um 67%, also ebenso stark wie die Bestrahlung mit 5000 r; womit der Weg der Strahlenwirkung über das H_2O_2 bewiesen war.**

*) Nicht an anderer Stelle erschienen.

**) Da zur Gärungshemmung etwa die 5-fache Strahlendosis erforderlich ist, so folgt, daß die Strahlenwirkung zwar über das H_2O_2, aber nicht über die Gärungshemmung geht.

Es stimmte zu diesem Ergebnis, daß Zusatz von Katalase bei der Bestrahlung oder Ersatz des Sauerstoffs durch Argon bei der Bestrahlung die Wirkung der Bestrahlung erheblich verminderte.

2. Krebszellen

Versuche mit Krebszellen, wobei die Ascites-Zellen des Ehrlichschen Mäusekarzinoms die Versuchszellen waren, haben bisher noch zu keinem endgültigen Ergebnis geführt, weil die Züchtung dieser Zellen in vitro heute noch nicht einfach genug ist und das Wachstum in vivo, in der Bauchhöhle der Maus, ein Test ist, der zu lange Zeiten beansprucht.

Nur soviel läßt sich heute zur Wachstumshemmung der Krebszellen durch Röntgenstrahlen sagen: Suspendiert man 0,5 cmm Zellen in 1 ccm isotoner Kochsalzlösung und m/100 Phosphat pH 7,5 und bestrahlt, bei einer Dosisleistung von 1400 r pro Minute, mit 2000 r, so wachsen die bestrahlten Zellen bei der Impfung in die Bauchhöhle nicht mehr an. Da man zur vollständigen Gärungshemmung wesentlich mehr r brauchen würde, ist also das Wachstum gegenüber Strahlen empfindlicher als die Gärung, und es kann die Wachstumshemmung nicht über die Gärungshemmung erfolgen; aber trotzdem kann die Wachstumshemmung über H_2O_2 erfolgen.

Bei der Zelldichte, bei der 2000 r die Krebszellen abtöten, benötigt man zum Abtöten eine H_2O_2-Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ Mikromolen H_2O_2 pro ccm oder $2 \cdot 10^{-5}$ Molen pro Liter. Theoretisch könnte diese H_2O_2-Konzentration von 2000 r erzeugt werden, wenn keine Wasserradikale zurückreagierten, praktisch aber ist in den meisten Medien die Ausbeute an H_2O_2 erheblich kleiner. Im Falle der Krebszellen ist also bisher der Weg über das Wasserstoffperoxyd noch nicht bewiesen.

Literatur

1 Warburg, O., und Kayser, D., dieses Buch, Seite 598.
2 Warburg, O., Geissler, A. W. und Lorenz, S., dieses Buch, S. 585.
3 Warburg, O., Schröder W., Gewitz, H. S. und Völker, W., Z. f. Naturforschg. 13 b, 591. 1958, sowie dieses Buch Seite 515.
4 Aebi, H. und Mitarbeiter, Helvet. Chim. Acta 42, 2531. 1959.
5 Dean A. C. und Hinshelwood, C., Proceed. Royal Soc. B, 146, 109, 1956.

91 Über Phosphorylierung im Licht*

Von Otto Warburg

Wenn in belichteten Grana stöchiometrische Mengen[1] von Benzo- oder Naphtochinonen Sauerstoff entwickeln, so sind die Gleichungen:

$$CO_2 = C + O_2 \quad [1]$$

$$2\ \text{Chinon} + C + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + CO_2 \quad [2]$$

$$\text{Bilanz:}\quad 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \quad [3]$$

Der Sauerstoff wird hierbei aus Kohlensäure entwickelt, nicht aus Wasser, wie es nach der Bilanzgleichung scheinen könnte. Dies ist kürzlich durch Versuche mit definierten, sehr niedrigen Kohlensäuredrucken, mit Hilfe der neuen Manometriegefäße, bewiesen worden[2].

Suspendiert man bei den stöchiometrischen Chinonreaktionen die Grana in Phosphatlösungen und setzt Adenosindiphosphat zu, so wird während der Sauerstoffentwicklung Phosphat zu Adenosintriphosphat gebunden[3], und zwar 1 Molekül Phosphat, wenn 2 Atome Wasserstoff von dem Chinon aufgenommen werden. Wie bei den Gärungen[4] liegt also hier eine Phosphorylierung durch Dehydrierung vor, nur ist hier der Dehydrator nicht Nikotinsäureamid, sondern Chinon.

Obwohl die Phosphorylierung in Grana bisher nur für die Grana bestimmter Spinatarten gefunden worden ist; obwohl die Phosphorylierung bei dem natürlichen pH 6,8 der Spinatblätter nicht gefunden wird; und obwohl die Phosphorylierung auf die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung keinen Einfluß hat[5], möchte ich doch glauben, weil die Bildung des Photolyten der Phosphorylierung bedarf (vergl. Seite 567 dieses Buches), daß bei den Granareaktionen immer Phosphat gebunden wird. Das gebundene Phosphat würde dann entweder durch Hydrolyse wieder frei oder von Adenosindiphosphat aufgenommen, zwei Reaktionen, deren Analoga man in vitro mit krystallisierten Gärungsfermenten demonstrieren kann[4].

Wenn nun die Phosphorylierung eine integrierende Teilreaktion der Granareaktionen ist, so ist damit ein weiterer Schritt getan, um die Sauerstoffentwicklung bei den Granareaktionen mit der Sauerstoffentwicklung bei der Photosynthese in Einklang zu bringen. Denn für die Photosynthese ist bewiesen worden[6], daß der Photolyt mit Hilfe von Phosphorylierungen aus Kohlensäure entsteht.

Zusammenhang zwischen Dehydrierung und Phosphorylierung bei den katalytischen Chinonreaktionen

Während der Zusammenhang zwischen Dehydrierung im Licht und Phosphorylierung im Licht bei den stöchiometrischen Chinonreaktionen durch den Quotienten 2 H: 1 P quantitativ festgelegt worden ist und deshalb als unzweifelhaft betrachtet werden muß, ist dieser Zusammenhang bei den katalytischen Chinonreaktionen heute noch Gegenstand von Diskussionen.

---

* Wird in der Festschrift für John Northrop im Journal of General Physiology erscheinen.

Die katalytischen Chinonreaktionen entstehen aus den stöchiometrischen Reaktionen dadurch, daß man das gebildete Hydrochinon immer wieder reoxydiert, entsprechend den Gleichungen:

$$2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \qquad [3]$$
$$O_2 + 2\ \text{Hydrochinon} = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O \qquad [4]$$

Bilanz: $0 = 0$ [5]

Bei den katalytischen Chinonreaktionen ist also die Bilanz der Dehydrierung null. Da aber trotzdem phosphoryliert wird, hat man hier, getäuscht durch die Bilanz, angenommen, daß ohne Dehydrierung, durch eine direkte Wirkung des Lichts — durch die „Lichtphosphorylierung" — phosphoryliert werde. In Wirklichkeit dehydriert das Chinon bei den katalytischen Chinonreaktionen ebenso wie bei den stöchiometrischen Reaktionen, da die stöchiometrischen Reaktionen Teile der katalytischen Reaktionen sind.

Daß diese Auffassung zutrifft, die den unwahrscheinlichen Dualismus der Phosphorylierungsmechanismen in den grünen Grana aus dem Wege räumt, wurde auf zwei Arten bewiesen. Erstens wurde gezeigt, daß m/1000 Phenanthrolin, das der spezifische Inhibitor der Grana-Dehydrierungen ist[1], auch bei den katalytischen Chinonreaktionen die Phosphorylierung hemmt. Zweitens wurde mit Hilfe von Blausäure gezeigt, daß bei den katalytischen Chinonreaktionen, obwohl ihre Bilanz null ist, Dehydrierung und Sauerstoffentwicklung weitergehen. Hemmt man nämlich die Katalase der Grana durch m/100 Blausäure, so wird nunmehr bei der Reoxydation des Hydrochinons die doppelte Menge Sauerstoff verbraucht wie vorher, während Dehydrierung und Sauerstoffentwicklung im Licht unverändert weitergehen. Die Folge ist, daß nunmehr in der Bilanz ein Sauerstoffverbrauch auftritt und daß Wasserstoffperoxyd ein Endprodukt wird:

$$2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \qquad [3]$$
$$2\ O_2 + 2\ \text{Hydrochinon} = 2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O_2 \qquad [4a]$$

Bilanz: $O_2 + 2\ H_2O = 2\ H_2O_2$ [5a]

Durch Zusatz von Blausäure zu den katalytischen Chinonreaktionen kann man also die Dehydrierung sichtbar und meßbar machen, und da in Blausäure die Phosphorylierung weitergeht, so kann man nunmehr auch bei den katalytischen Chinonreaktionen, wie vorher bei den stöchiometrischen Chinonreaktionen, das Verhältnis von Dehydrierung zu Phosphatbindung bestimmen. Wie bei den stöchiometrischen Chinonreaktionen findet man das Verhältnis 2 H: 1 P.

Zusammenhang zwischen Dehydrierung und Phosphorylierung bei den anaeroben Chinon-Katalysen

Gegen unsere Ergebnisse ist eingewendet worden, daß man bei den Chinonkatalysen auch dann Phosphorylierung findet, wenn die Bedingungen anaerob sind. Zum Beispiel findet man starke Phosphorylierung, wenn man Spinatgrana mit Spuren eines Naphtochinons, z. B. des Vitamins K, in Argonatmosphäre belichtet. Wie aber soll Vitamin K fortgesetzt hydriert und von Sauerstoff wieder reoxydiert werden, wenn der zur Reoxydation notwendige Sauerstoff fehlt?

Zunächst hat sich zeigen lassen, daß m/1000 Phenanthrolin, der spezifische Inhibitor der Grana-Dehydrierungen, auch die anaerobe katalytische Phosphorylierung hemmt. Auch an der anaeroben katalytischen Phosphorylierung ist also die Dehydrierung beteiligt, während der zur Reoxydation des Hydrochinons notwendige Sauerstoff von der Reaktion stammt, von der alle Granareaktionen ausgegangen sind:

$$2\ \text{Chinon} + 2\ H_2O = 2\ \text{Hydrochinon} + O_2 \qquad [3]$$

Es ist kein Grund, daß diese Reaktion anaerob nicht vor sich gehen sollte. Chinon + Grana + Licht bedeutet immer, daß Sauerstoff zur Verfügung steht, auch wenn der Gasraum der Manometriegefäße keinen Sauerstoff enthält.

Weiterhin hat sich gezeigt, daß n/100 Blausäure zwar die aeroben katalytischen Chinonreaktionen *nicht* hemmt, aber die anaeroben katalytischen Chinonreaktionen *vollständig* hemmt. In der Tat reicht in n/100 Blausäure, gemäß unseren Gleichungen, der entwickelte Sauerstoff zur Reoxydation des Hydrochinons nicht aus, und so muß in n/100 Blausäure die Chinonkatalyse und damit die Phosphorylierung schnell zum Stillstand kommen. Aerob jedoch, wo der Sauerstoff der Luft zur Reoxydation des Hydrochinons zur Verfügung steht, ist kein Grund, daß n/100 Blausäure die Phosphorylierung hemmt, und tatsächlich findet man, wie schon erwähnt, aerob in n/100 Blausäure keine Hemmung der Phosphorylierung. Damit ist durch eine Kette ineinandergreifender Experimente bewiesen, daß auch die anaerobe katalytische Phosphorylierung durch Dehydrierung bewirkt wird.

Zusammenfassung*

Während früher der Zusammenhang zwischen Dehydrierung und Phosphorylierung im Licht nur für die stöchiometrischen Chinonreaktionen bewiesen worden war, ist nunmehr auch für die katalytischen Chinonreaktionen gezeigt worden, daß die Dehydrierung im Licht die treibende Kraft für die Phosphorylierung liefert. Eine andere Phosphorylierung als die Phosphorylierung durch Dehydrierung, gibt es in den grünen Grana nicht.

Natürlich entsteht nunmehr die Frage, welche Substanz das Substrat der Dehydrierung und Phosphorylierung ist. Da die Grana keine Dunkelatmung haben und deshalb im Dunkeln nicht phophorylieren können, auch nicht nach Zusatz von Chinon, so muß das gesuchte Substrat im Licht entstehen, und da der Photolyt der Granareaktionen eine Kohlensäureverbindung ist, so muß das gesuchte Substrat eine im Licht entstehende Kohlenstoffverbindung sein. Wegen der Gärungen und dem einzigen bisher bekannten chemischen Mechanismus der Phosphorylierung denkt man an Triosephosphat. Aber chemisch ist jeder Aldehyd möglich.

Literatur

1 Warburg, O., und Lüttgens, W., Die Naturwissenschaften 32 (1944), 161, 301. O. Warburg, Heavy Metals and Enzyme Action. Clarendon Press, Oxford (1949).
2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschung 15b (1960), 367 und Seite 481 dieses Buchs.
3 Arnon, D., Light and Life. The Johns Hopkins Press, Baltimore (1961).
4 Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Z. 303 (1939) 40. E. Negelein und H. Brömel, Bioch. Z. 303 (1939) 132.
5 Warburg, O., Krippahl, G., Gewitz, H. S. und Völker, W., Z. f. Naturforschung 14b (1959), 712.
6 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschung 15b (1960), 788 und Seite 567 dieses Buches.

*) Nicht an anderer Stelle erschienen.

92 Beweis, daß der Photolyt der Photosynthese eine Kohlensäureverbindung ist*

Von Otto Warburg

Da noch immer gelehrt wird, daß der Photolyt der Photosynthese Wasser ist und daß die Reduktion der Kohlensäure eine sekundäre Dunkelreaktion ist, bei der Dihydro-Nikotinsäureamid phosphorylierte Phosphoglycerinsäure zu Triosephosphat reduziert[1], so sei hier kurz beschrieben, in wie einfacher Weise man sich heute von der wahren Natur des Photolyten überzeugen kann.

In normal gezüchteter Chlorella wird mit Hilfe der Energie der Atmung der Photolyt der Photosynthese im Dunkeln bis zur Chlorophylläquivalenz angehäuft, was bei 20° in etwa 30 Minuten geschehen ist. Säuert man dann die Zellen im Dunkeln mit m/1000 Fluorwasserstoffsäure an, so entwickelt der Photolyt 1 Mol Kohlensäure. Belichtet man andrerseits die nicht angesäuerten Zellen, so entwickelt der Photolyt 1 Mol Sauerstoff.

Treibt man die Kohlensäure im Dunkeln mit Säure aus und belichtet dann die angesäuerten Zellen, so treibt das Licht keinen Sauerstoff aus. Treibt man mit Licht den Sauerstoff aus und säuert dann die belichteten Zellen im Dunkeln an, so treibt die Säure keine Kohlensäure aus.

Treibt man die Kohlensäure mit Säure aus und wäscht dann die Säure fort, so kann der Photolyt mit Hilfe der Atmung im Dunkeln wieder angehäuft werden und entwickelt dann beim Ansäuern im Dunkeln wieder Kohlensäure, beim Belichten Sauerstoff. Verdunkelt man, nachdem man mit Licht den Sauerstoff ausgetrieben hat und wartet 30 Minuten, bis die Atmung den Photolyten wieder angehäuft hat, so kann Licht wieder Sauerstoff und Säure wieder Kohlensäure austreiben.

Die Kohlensäureentwicklung im Dunkeln und die Sauerstoffentwicklung im Licht hängen also in einer Weise zusammen, wie es nur möglich ist, wenn es dieselbe Substanz ist, die im Dunkeln die Kohlensäure und im Licht den Sauerstoff entwickelt. Auch daß der Photolyt sich nur bei höheren Kohlensäuredrucken in Chlorella anhäuft, könnte hier, wenn noch weitere Gründe nötig wären, angeführt werden.

Die manometrischen Ausschläge bei den angeführten Versuchen sind erheblich. Beträgt die Chlorellamenge pro Manometriegefäß 100 mm^3 und sind die Zellen normal gezüchtet, so erhält man beim Ansäuern 25 bis 30 mm^3 Kohlensäure oder beim Belichten 25 bis 30 mm^3 Sauerstoff. Diese Ausschläge lassen sich durch Vermehrung der eingesetzten Zellmengen beliebig vergrößern.

Es ist uns bisher nicht gelungen, den Photolyten präparativ zu gewinnen. Er ist die empfindlichste Substanz, die wir in der Zellphysiologie angetroffen haben. Nicht nur, daß der Photolyt zu seiner Entstehung der Atmung bedarf, sondern er bedarf auch zu seiner Erhaltung der Atmung und zerfällt unter Kohlensäure-

* Erscheint nicht an anderer Stelle.

entwicklung, wenn man die Atmung durch Sauerstoffentziehung hemmt. Bei allen Maßnahmen, die präparativ in Betracht kommen, zerfällt der Photolyt bereits innerhalb der Chlorella unter Kohlensäureentwicklung.

So scheint die Aufklärung der Photosynthese ähnliche Wege zu gehen, wie früher die Aufklärung der Atmung, bei der Versuche mit intakten lebenden Zellen die entscheidenden Versuche gewesen sind. Ein derartiger entscheidender Versuch ist hier die Anhäufung des Photolyten in der lebenden Chlorella, die in solchen Mengen gelungen ist, daß man viele Eigenschaften des Photolyten im Leben bestimmen kann. Solche Versuche haben den Vorzug, daß über die biologische Bedeutung der Ergebnisse kein Streit möglich ist. Denn die Teste der Versuche sind die Lebensvorgänge selbst.

Schließlich sei noch erwähnt, daß der Photolyt die Theorie der 1950 entdeckten 1-Quanten-Reaktion[3] in glänzender Weise bestätigt hat. Die Substanz, aus der 1 Lichtquantum 1 Molekül Sauerstoff entwickelt, ist zwar nicht von den Zellen getrennt, aber sie steht innerhalb der Zellen in beliebiger Menge zur Verfügung. Es ist bewiesen, daß diese Substanz eine Kohlensäureverbindung ist, und es ist bewiesen, daß diese Kohlensäureverbindung durch die Energie der Atmung aus Kohlensäure entsteht.

Zusatz im September 1961. In der Hoffnung, die alte Theorie der Photosynthese zu retten, ist die Frage gestellt worden, ob der Photolyt nicht die Phosphoglycerinsäure sein kann. Die Antwort lautet:

Der Photolyt erscheint im Dunkeln und verschwindet im Licht unter Sauerstoffentwicklung. Die Phosphoglycerinsäure erscheint im Licht und verschwindet im Dunkeln. Keine Eigenschaft des Photolyten, die im Leben bestimmt worden ist, stimmt zu den Eigenschaften der Phosphoglycerinsäure, weder die CO_2-Entwicklung beim Ansäuern, noch die CO_2-Entwicklung bei Fortnahme des Sauerstoffs noch die CO_2-Entwicklung bei Senkung des CO_2-Drucks. Alles aber stimmt zu der Auffassung, daß die Phosphoglycerinsäure ein Zwischenprodukt der lichtinduzierten Kohlehydratverbrennung ist.

Literatur

1 Die Reaktion ist 1939 [Bioch. Z. 303 (1939), 40] in Dahlem entdeckt, aber ohne unsere Schuld auf die Photosynthese angewandt worden.

2 Warburg, O., und Krippahl, G., Z. f. Naturforschung 15b (1960), 788, und Seite 567 dieses Buches.

3 Burk, Dean, und Warburg, O., Z. f. Naturforschung 6b (1951), 12. O. Warburg, Die Naturwissenschaften 43 (1956), 237, wo zum erstenmal in unseren Gleichungen die Photolyse des Wassers durch die Photolyse der Kohlensäure ersetzt worden ist.

93 Über die fakultative Anaerobiose der Krebszellen und ihre Anwendung auf die Chemotherapie*

Von Otto Warburg

Die Idee, daß das Leben ohne Sauerstoff die allgemeine Lösung des Krebsproblems ist, lag nach der Entdeckung der Gärung der Krebszellen nahe und erhielt ihre erste experimentelle Stütze durch die Arbeit „Anaerobiose der Krebszellen", in der wir zeigten[1], daß die Zellen des Jensen-Sarkoms nach 5tägiger Anaerobiose in zuckerhaltigem Serum unvermindert transplantierbar sind; daß sie aber anaerob in zuckerfreiem Serum schnell zugrunde gehen; während sie aerob ohne Zucker am Leben bleiben. Die Krebszellen verhielten sich also bei diesen Versuchen wie fakultative Anaerobier; wie Hefezellen, die anaerob mit Hilfe der Gärung leben können, aber aerob auch ohne Gärung leben können. Seitdem haben wir nicht aufgehört zu bedauern, daß Pasteur diese interessanteste Anwendung des von ihm entdeckten Lebens ohne Sauerstoff nicht erlebt hat; und seitdem gehören die Arbeiten Pasteurs über das aerobe und anaerobe Leben der Hefe zu den Grundlagen der Krebsforschung.

Im folgenden soll eine kurze Übersicht über die Entwicklung der letzten Jahre gegeben werden, in denen die Anaerobiose der Krebszellen endgültig bewiesen worden und zum Ausgangspunkt chemotherapeutischer Versuche gemacht worden ist.

1. Gärung und Atmung der Ascites-Krebszellen

Gäbe es Krebszellen, die nur gären und nicht atmen, so wäre ein anderer Beweis der Anaerobiose der Krebszellen nicht notwendig. Solche Krebszellen sind bisher nicht gefunden worden, aber seit unsere Versuchsobjekte[2] die fast reinen Krebszellen-Suspensionen der Asciteskrebse geworden sind, sind die Gärungsgrößen der Krebszellen so sehr gestiegen und die Atmungsgrößen der Krebszellen so sehr gefallen, daß wir uns dem Zustand „Gärung ohne Atmung" wesentlich genähert haben.

Für Ascites-Krebszellen in frischem Serum werden heute bei uns $Q_M^{N_2}$-Werte von $+70$, in den USA[3] sogar Werte von über $+100$ gefunden, also Milchsäureproduktionen von 30 bis 40% des Zelltrockengewichts pro Stunde. Wären diese Zellen embryonale Zellen, so müßte ihre Atmung betragen[4]:

$$Q_{O_2} = \frac{+70}{-1{,}5} = -47 \qquad \text{oder } \frac{+100}{-1{,}5} = -67$$

während wir für die Krebszellen mittlere Atmungswerte von -7 finden.

Seitdem, seit 1953, haben wir an der Anaerobiose der Krebszellen nicht mehr gezweifelt und unsern Arbeiten über Krebs die Anaerobiose der Krebszellen zu-

* Charles Huggins, Chicago, zu seinem 60. Geburtstag am 22. September gewidmet (wird in der University of Chicago Press erscheinen).

grunde gelegt. Unter Anaerobiose verstehen wir dabei nur das anaerobe Leben und Wachstum in vivo und nicht das Verhalten der Krebszellen in Gewebekulturen, das in der Vergangenheit zu Irrtümern Anlaß gegeben hat.

2. Anaerobiose der Krebszellen in vivo

1. Da Ascites-Krebsserum immer große Mengen des Gärungsferments Zymohexase enthält und da die Zymohexase von den Krebszellen nur unter anaeroben Bedingungen abgegeben wird, so haben wir 1952 den Schluß gezogen, daß die Zymohexase in dem frischen Ascites von den anaeroben Bedingungen herrührt, unter denen sich die Krebszellen im lebenden Tier im wesentlichen befinden; und daß wahrscheinlich die früher gefundene Zymohexase im Blutserum tumortragender Ratten[6] ein Zeichen dafür ist, daß sich Teile der soliden Tumoren im Leben unter anaeroben Bedingungen befinden. Es sei angemerkt, daß in dem Blutserum gravider Tiere niemals erhöhte Zymohexase-Werte gefunden worden sind.

2. Besser als durch die Zymohexaseversuche ist die Anaerobiose der Krebszellen in vivo 1955 durch Malmgreen und Flanigan[7] bewiesen worden. Injiziert man Tetanus-Sporen, die nur anaerob keimen, gesunden Mäusen, so erkranken sie nicht an Tetanus, wie schon lange bekannt ist. Injiziert man aber Tetanus-Sporen Tumormäusen, so sterben die Mäuse immer an Tetanus, gleichgültig, ob die Tumoren groß oder klein, ob sie nekrotisiert oder nicht nekrotisiert sind. Gravide Mäuse verhielten sich wie die gesunden Mäuse, erkrankten also nach Injektion der Tetanus-Sporen nicht.

Die Versuche von Malmgreen und Flanigan sind nicht nur wichtig, weil sie die Anaerobiose der Krebszellen in vivo beweisen, sondern sie sind ebenso wichtig, weil sie die Aerobiose der embryonalen Zellen in vivo beweisen und damit den destruktivsten Irrtum dieses Arbeitsgebiets widerlegen, daß das embryonale und allgemein das normale Wachstum der höheren Lebewesen ein anaerober Vorgang sei. In der Tat geht aus den Versuchen von Malmgreen und Flanigan hervor, daß es die Krebszellen alleine sind, die im Körper anaerob leben und wachsen.

Man kann hier nicht einwenden, daß es vielleicht kleine unsichtbare Nekrosen in den Tumoren seien, die frei von Sauerstoff sind und in denen deshalb die Tetanus-Sporen auskeimen. Denn nekrotische Zellen haben keinen Stoffwechsel, so daß in Nekrosen, die von sauerstoffhaltigen Zellen umgeben sind, der Sauerstoffdruck der Umgebung herrschen muß. Im übrigen ist der Einwand bezüglich der Nekrosen von J. und G. Möse[8] noch auf andere Art widerlegt worden. J. und G. Möse fanden, daß obligat anaerobe Sporen von Clostridium butyricum nicht nur in soliden Tumoren, sondern auch in Ascites-Krebsen auskeimen, also in Krebsen, in denen es aus geometrischen Gründen Nekrosen nicht gibt.

3. Vor kurzem hat Fr. Frimmer[9] mit einer chemischen Methode die Anaerobiose des Ascites-Krebses wahrscheinlich gemacht. Frimmer injizierte in den Ascites-Krebs von Mäusen das Krebs-Cytostaticum Bayer E 39, das ein Benzochinon ist, und fand, daß es kurze Zeit nach der Injektion in dem Ascites als Hydrochi-

non vorliegt. Da sich aber das Hydrochinon des E 39 auch bei niedrigen Sauerstoffdrucken schnell zu Chinon reoxydiert, so kann der Ascites-Krebs nur wenig Sauerstoff enthalten.

3. Anwendungen auf die Chemotherapie

Wenn heute die fakultative Anaerobiose der Krebszellen als eine gesicherte Tatsache betrachtet werden darf, so hat man in vivo einen Unterschied zwischen Krebszellen und normalen Zellen, wie er fundamentaler nicht gedacht werden kann, und wir würden uns wundern, wenn unsere Voraussage[10] nicht in Erfüllung ginge, daß die „Grundlage der Chemotherapie der Krebszellen die Anaerobiose der Krebszellen sein wird". Es sind zwei Wege, die zur Zeit in dieser Richtung beschritten werden.

1. J. und G. Möse haben in dem Versuch von Malmgreen und Flanigan die Tetanus-Sporen durch nicht pathogene obligat anaerobe Sporen des Clostridium butyricum ersetzt und konnten durch die Injektion solcher Sporen in die Blutbahn tumortragender Mäuse einen großen Prozentsatz der Tumoren zum Verschwinden bringen.

2. Da anaerobe Bakterien nach Mc Leod und Gordon und nach O.T. Avery nur wenig oder keine Katalase enthalten[11], so war zu erwarten, daß Krebszellen, als fakultative Anaerobier, weniger Katalase enthalten als die obligat aeroben embryonalen Zellen und daß Krebszellen deshalb empfindlicher gegen Wasserstoffperoxyd sein werden als normale Körperzellen. Diese Erwartung ist in den Jahren 1957 bis 1961 in Dahlem sehr allgemein bestätigt worden[10, 12]. Auf der Basis der Anaerobiose der Krebszellen ist hierdurch eine neue selektive Empfindlichkeit der Krebszellen gefunden worden, deren Ausnutzung für die Chemotherapie möglich erscheint. 10^{-4} normale Lösungen von Wasserstoffperoxyd können Ascites-Krebszellen in vitro bei 25^0 in 30 Minuten abtöten.

Zunächst allerdings steht der Anwendung in vivo der große Katalasegehalt der roten Blutzellen im Wege. Würde es aber gelingen, für die Dauer der Wasserstoffperoxydbehandlung die roten Blutzellen aus dem Kreislauf zu entfernen, so könnte Wasserstoffperoxyd ein wirksames Krebstherapeutikum werden. Eine Arbeitsgemeinschaft des Physikers Manfred v. Ardenne und des Chirurgen Sprung in Dresden ist zur Zeit mit einer Untersuchung dieser Möglichkeiten beschäftigt.

3. Nachdem die selektive Empfindlichkeit der Krebszellen gegen Wasserstoffperoxyd gefunden worden war, lag die Idee nahe, Wasserstoffperoxyd in den Krebszellen durch Autoxydationen entstehen zu lassen. Zum Beispiel wurden von Glogner, Wolf und H. Holzer[15] chinoide Farbstoffe oder Chinone — die Oxydantien der Wielandschen sauerstofflosen Atmung — in Krebszellen hineingebracht, wo sie durch die wasserstoffübertragenden Fermente reduziert und dann durch Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reoxydiert wurden, Vorgänge, deren chemischer Mechanismus vor vielen Jahren in Dahlem aufgeklärt worden ist[13].

Die interessanteste dieser Anwendungen auf die Chemotherapie ist eine Arbeit

von J. PÜTTER[14], der fand, daß die Cytostatica der Farbwerke Bayer, E 39 und Bayer 3366, die beide Chinone sind, in Sauerstoff viel stärker auf Krebszellen wirken als in Stickstoff und daß ihre Wirksamkeit durch Zusatz von Katalase geschwächt wird; daß also die Wirkung dieser Cytostatica wahrscheinlich über Wasserstoffperoxyd erfolgt. In denjenigen Fällen, in denen Sauerstoff die Wirkung einer chinoiden Substanz verstärkt, aber Katalase die Wirkung nicht schwächt, ist daran zu denken, daß nicht H_2O_2, sondern das unbeständige Zwischenprodukt HO_2 wirksam ist, also H_2O_2 in statu nascendi.

4. Bei allen Anwendungen der Anaerobiose der Krebszellen auf die Chemotherapie der Tumoren darf nicht vergessen werden, daß jeder Tumor einen aeroben Teil enthält, der soweit reicht, als der Sauerstoff des arteriellen Blutes reicht. Nur dieser Teil kann durch die Chinone geschädigt werden, die zu ihrer Wirkung des Sauerstoffs bedürfen. Nur der andere, der anaerobe Teil der Tumoren, kann von obligat anaeroben Sporen geschädigt werden, die zu ihrer Keimung der Abwesenheit des Sauerstoffs bedürfen. Diese Überlegung zeigt, daß nur eine Kombination der beiden Methoden Aussicht hat, Tumoren in vivo abzutöten. Das Anwachsen der Metastasen aber wird nur ein *aerob* wirksames Cytostaticum verhindern können. Die Sauerstoffversorgung der Tumoren wird also den Erfolg vieler chemotherapeutischer Maßnahmen entscheidend beeinflussen.

Für die Abtötung von Krebszellen durch *zugesetztes* Wasserstoffperoxyd gelten diese Überlegungen nicht, da Wasserstoffperoxyd aerob und anaerob gleich wirksam ist.

Literatur

1 OKAMOTO, YOSICHI, Bioch. Z. 160 (1925), 52.
2 WARBURG, O., und HIEPLER, E., Z. f. Naturforschung 7b (1952), 193.
3 SCHADE, A. L., Biochem. et Biophys. Acta 12 (1953), 163.
4 WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A. W., und LORENZ, S., Hoppe-Seyler 321 (1960), 252, wo man die Stoffwechselquotienten der embryonalen Zellen und ihre Meyerhof-Quotienten findet.
5 WARBURG, O., GAWEHN, K., und LANGE, G., Z. f. Naturforschung 9b (1935), 109.
6 WARBURG, O., und CHRISTIAN, W., Bioch. Z. 314 (1943), 339.
7 MALMGREEN, R. M., und FLANIGAN, C. C., Cancer Research 15 (1955), 473.
8 MÖSE, J. R., Z. f. Krebsforschung 63 (1959), 63.
9 FRIMMER, M., Med. Exp. 3 (1960), 135.
10 WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A. W., SCHRÖDER, W. GEWITZ, H. S., und VÖLKER, W., Archives of Biochemistry 78 (1958), 573.
10a Mc JEOD, J. W. and GORDON, J. Biochem. Journal 16 (1922), 499.
11 AVERY, O. T., J. Exp. Med. 39 (1924), 275, 347, 357.
12 WARBURG, O., GAWEHN, K., und GEISSLER, A. W., Z. f. Naturforschung 12b (1957), 393; 13b (1958), 588. O. WARBURG und W. SCHRÖDER, Z. f. Naturforschung 15b (1960), 163, sowie Seite 585 dieses Buches.
13 WARBURG, O., und CHRISTIAN, W., Bioch. Z. 260 (1933), 499; 266 (1933), 377. O. WARBURG, Heavy Metals and Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford 1949, Seite 179.
14 PÜTTER, J., Z. f. Krebsforschung 64 (1961), 101.
15 P. GLOGNER, H P. WOLF u. H. HOLZER, HOPPE, SEYLER 332, (1960) 407.

94 Über die Klassifizierung der Krebszellen auf der Basis der Anaerobiose in vivo*

Von Otto Warburg

Bei unserer früheren Klassifizierung der Krebszellen ist es ein Fehler gewesen, sie auf der Basis der aeroben Gärung in vitro vorzunehmen. Denn der Stoffwechsel aller Körperzellen, der normalen wie der Krebszellen, enthält eine latente Gärungskomponente, die man in vitro durch die verschiedensten Maßnahmen manifest machen kann. Die aerobe Gärung in vivo wäre geeigneter zur Klassifizierung der Krebszellen gewesen, da aerobe Gärung beim Wachstum in vivo wahrscheinlich in normalen Körperzellen nicht vorkommt, doch soll diese Modifikation der alten Klassifizierung hier nicht vorgeschlagen werden.

Ein anderer unserer Vorschläge zur Klassifizierung der Krebszellen betraf die zu kleine Atmung der Krebszellen. Ascites-Krebszellen der Maus haben in Serum einen anaeroben Gärungswert $Q_{II}^{N_2} = 70$ und müßten, wenn sie embryonale Zellen wären, einen Atmungswert von 70/1,5 = 47 haben, während sie in Wirklichkeit einen 7mal kleineren Atmungswert, nämlich $Q_{O_2} = 7$, haben. So war es gemeint, wenn wir von der zu kleinen Atmung der Krebszellen sprachen. Da es aber im Körper normale Gewebe gibt, deren Atmung kleiner als 7 ist — der Atmungswert des Bindegewebes zum Beispiel ist kleiner als 1 —, so kann man immer Listen zusammenstellen, aus denen hervorgeht, daß die Atmung der Krebszellen nicht kleiner, sondern größer ist als die Atmung der normalen Körperzellen. Deshalb hat die Klassifizierung der Krebszellen auf der Basis ihrer zu kleinen Atmung zu unfruchtbaren Kontroversen geführt.

Eine Eigenschaft der Krebszellen, die ihre große Gärung, ihre zu kleine Atmung, ihren Mangel an Eisenoxygenase, Peroxydase und Katalase zu einer höheren Einheit zusammenfaßt, ist die fakultative Anaerobiose der Krebszellen in vivo. Klassifizieren wir die Krebszellen auf dieser Basis, so tun wir sachlich nichts Neues, aber wir drücken die Tatsachen in einer weniger angreifbaren Form aus. Denn dann ist es gleichgültig, ob es im Körper oder anderswo aerobe Glykolyse normaler Zellen gibt; ob die aerobe Glykolyse der Netzhaut erst beim Präparieren entsteht oder ob sie schon vorher im Leben vorhanden gewesen ist; ob die aerobe Glykolyse der Myelocyten erst beim Absterben im strömenden Blut entsteht, oder ob sie schon vorher beim Wachstum im Knochenmark vorhanden gewesen ist; ob die Atmung der Krebszellen klein ist im Vergleich zu ihrer Gärung oder ob sie *nicht* klein ist im Vergleich zur Atmung aller übrigen Körperzellen.

Es berührt auch die Klassifizierung nicht, sondern es ist ein anderes Problem, ob die Krebszellen durch Selection oder durch Mutation entstehen; ob bei der Krebsentstehung zuerst die Atmung sinkt und dann die Gärung steigt oder ob es umgekehrt ist; ob Sauerstoffmangel häufig oder niemals die Krebsentstehung verursacht usw. Ausschlaggebend für die Klassifizierung ist alleine eine Eigenschaft,

---

*) Nicht an anderer Stelle erschienen.

für die nicht ein spezielles biochemisches Merkmal, sondern das Leben selbst der Test ist, die Anaerobiose, deren Bedeutung seit Pasteur alle Biologen und Mediziner verstehen und die wegen der anaeroben Vergangenheit des Lebens fast von selbst auf die letzten Ursachen des Krebses hinführt.

Im übrigen lenkt die Klassifizierung der Krebszellen auf der Basis der Anaerobiose die Aufmerksamkeit auf therapeutische Möglichkeiten. Die Abtötung von Tumoren durch Wasserstoffsuperoxyd in statu nascendi oder durch Injektion obligat anaerober Sporen sind direkte Konsequenzen der Anaerobiose der Krebszellen.

95 Über Phosphorylierung durch Dehydrierung

(Nachtrag zur Oxydationsreaktion der Gärung, Seite 231 bis 235)

Von Otto Warburg

Die Bedeutung der Oxydationsreaction der Gärung ist keineswegs auf die Phosphorylierung bei den Gärungen beschränkt, sondern die Reaktion repräsentiert den chemischen Mechanismus der Phosphorylierung durch Dehydrierung, der 1939 in Dahlem entdeckt worden ist und der wahrscheinlich der allgemeine Mechanismus der biologischen Phosphorylierung ist insofern, als durch Fortnahme von 2 H-Atomen 1 Molekül Phosphorsäure (oder 1 Molekül Pyrophosphorsäure) gebunden wird. In den 21 Jahren seit 1939 ist kein anderer Mechanismus der biologischen Phosphorylierung gefunden worden. Von allen Phosphorylierungen, die an der Photosynthese beteiligt sind, von den Phosphorylierungen im Dunkeln wie im Licht, haben wir in der letzten Zeit bewiesen, daß sie Phosphorylierungen durch Dehydrierung sind.

Abgesehen von der Phosphorylierung hat die Klärung der Oxydationsreaktion der Gärung noch eine andere Bedeutung. Denn durch papierchemische Diskussionen dieser Reaktion ist versucht worden, die alten Ideen über Oxydo-Reduktionen durch SH-Gruppen der Proteine in die moderne Fermentchemie wieder hineinzubringen, aus der solche Ideen durch quantitative Experimente mit reinen Fermenten eliminiert worden waren.

Sachverzeichnis

Aethylendiamintetraessigsäure, Hilfsmittel zur Kristallisation von Fermenten 223
Aethylendiamintetraessigsäure, zur Stabilisierung von H_2O_2 585
Alkohol, Entstehung in der Natur 211
Alkohol, Reaktionsgleichung der Entstehung in der Natur 47
Aminosäuren in Chlorella. Versuche mit $^{14}CO_2$ 384
Anaerobiose, fakultative, der Krebszellen
  Anwendung auf die Chemotherapie 629.
  Als Basis der Klassifizierung der Krebszellen 631.
  Die Versuche von Malmgreen und Flanigan 628.
  Die Versuche von Möse und Möse 628.
Anaerobiose der Krebszellen, partielle 524
Ascites-Krebszellen, Stoffwechsel und Verhalten der Zymohexase 197
Ascorbinsäure, manometrische Bestimmung 541
Atmung, Kompensation durch Licht in Chlorella 100
Atmung, Vernachlässigung bei der Messung des Quantenbedarfs bei hohen Lichtstärken 202

Blätter, Quantenbedarf 542

Carotinoid-Oxygenase in Chlorella 431
Chemotherapie von Tumoren 247
Chinonreaktionen im Licht
  Entdeckung der lichtinduzierten Atmung 465
  H_2O_2-Bildung bei den katalytischen Reaktionen 465
  Lichtinduzierte Atmung 19
  „Lichtphosphorylierung" 624
  Phosphorylierung bei den katalytischen Chinon-Reaktionen 466
  Stöchiometrische und katalytische Reactionen 462
  Wirkung der Blausäure 19, 464
  Wirkung des Phenanthrolins 622
Chlorella
  Aminosäuren 384
  Carotinoid-Oxygenase 431
  D-Milchsäure 423
  Glutaminsäure, Zerfall und Wiederaufbau 400, 609
  Glykolsäure 458
Chlorella
  Kohlensäureentwicklung durch Fluorid 347, 400, 567, 615
  Kohlensäurehalbwert-Drucke der Photosynthese 481
  Lichtinduzierte Atmung 274, 289, 421
  Mikroelemente 207, 257, 264
  Photolyt 567, 625
  Quantenbedarf 447, 452, 484, 582
  1-Quantenreaktion 16, 135, 278, 289, 418, 421
  Salzlösungen K, S und S* 256, 257, 265, 359, 402
  Sauerstoffhalbwert-Drucke der Atmung und Photosynthese 427
  Sauerstoffkapazität 274, 289
  Sauerstoffübertragung im Licht 595
  Vanadium 264, 312
  Wasserstoffperoxydbildung im Licht 467, 606
  Wirkung des blaugrünen Lichts 242
  Züchtung in fluktuierendem Licht 295, 361, 414
  Züchtung von Zellen verschiedener Eigenschaften 401
Chlorophyll, Sauerstoffübertragung im Licht in wässrigen Lösungen von Thioharnstoff, Hydrochinonen und Ascorbinsäure 595
Cyanwasserstoffsäure
  Definierte Konzentrationen bei der Manometrie 553
  Hemmung der Katalase in Chlorella 465
  Hemmung der Wirkung des blaugrünen Lichts 255
  Hemmung der „Lichtphosphorylierung" bei niedrigem Sauerstoffdruck, Nichthemmung bei höheren Sauerstoffdrucken 465
  Hemmung der Photosynthese 617
  Hemmung des Zerfalls der Glutaminsäure in Chlorella 405, 350
  Hemmung des zweiten Schritts der Synthese des Photolyten in Chlorella 615
Cyto-Deutero-Porphyrin 178
  Tribromderivat 187
Cytohämin aus Herzmuskel 175

Deuteroporphyrine, Synthesen 189

Embryonaler Stoffwechsel, Umwandlung in Krebsstoffwechsel 539, 548
Embryonaler Stoffwechsel, Umwandlung in Krebsstoffwechsel, Nachweis eines chemischen Faktors 562

Ferricyankalium, Reduktion durch lebende Chlorella, dunkel und hell 313
Ferricyankalium, Sauerstoffentwicklung im Licht aus Chlorella 316
Flavin-Nucleotid, Demonstration der Wasserstoffübertragung mit Hilfe von Fluoreszenz 211
Fluoreszenz, Demonstration der biologigischen Wasserstoffübertragungen 211, 212
Fluorid, Austreibung von Kohlensäure aus Chlorella 347, 400, 567, 615
Fluorid-induzierte Atmung in Chlorella, verbunden mit der Resynthese der Glutaminsäure 406, 611, 613

Gärungsfermente im Blut von Tumortieren 71
Gärungsfermente, Kristallisation und optische Teste 47
Gärungsfermente, Spezifizität 52
Glykolsäure in Chlorella 458
Glutaminsäure in Chlorella
  Entdeckung der Funktion bei der Photosynthese 383
  Funktion bei der Photosynthese 411, 567
  Hemmung der Zerfalls durch Blausäure 405
  Stöchiometrische Beziehung zur aeroben CO_2 409
  Stöchiometrische Beziehung zum Chlorophyll 571
  Stöchiometrische Beziehung zum Photolyten 572
  Stöchiometrische Beziehung zur Sauerstoffkapazität 572
  Zerfall und Wiederaufbau 400, 609

Harden-Youngsche Gleichung 63
Hefezymohexase, Kristallisation als Quecksilbersalz 220
Hilfsmittel zur Stabilisierung von H_2O_2 585
Hillreaktionen
  Bestimmung der notwendigen Kohlensäuredrucke 481
  Die lichtinduzierte Atmung, der Schlüssel zu den Hillreaktionen 19
  Notwendigkeit der Kohlensäure 435
  Hydroxy-Tyramin, ein biologischer Oxydationskatalysator der O_2-Entwicklung 583

Katalase, Abnahme in Nierenzellen bei der Kultur in vitro 511
Katalase, Zusatz bei der Bestrahlung der Krebszellen 521
Knochenmark, Stoffwechsel der trypsinisierten Zellen 557
Kohlenoxyd, Hemmung der Atmung in Keimblättern 443
Kohlenoxyd, Hemmung der Photosynthese in Keimblättern 443
Kohlensäure und Chlorophyll 301
Kohlensäure, Retention 239, 372, 376
Kohlensäuredruck, Einfluß auf den Quantenbedarf der Photosynthese 582
Kohlensäuredruck, Einfluß auf die Synthese des Photolyten 567
Kohlensäure-Gleichgewichtsdrucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen 578
Kohlenstoffatom 10 des Chlorophylls 304, 311
Kohlenstoff-Fixierung in Chlorella, manometrische Messung 469
Kompensation der Atmung bei der Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese 108, 109
Krebsforschung, Vortrag 244
Krebs, Prophylaxe 247
Krebsstoffwechsel, Entstehung bei der Kultur von embryonalen Zellen nach Dulbecco-Vogt 539, 548
Krebsstoffwechsel, Entstehung bei der Kultur von Nierenzellen nach Dulbecco-Vogt 505, 511
Krebszellen, Messung der Atmung mit einer neuen 1-Gefäßmethode 618
Krebszellen, Schädigung durch Sauerstoff 216
Krebszellen, Vortrag 322
Krebszellen, Zusammenhang zwischen Gärung und Malignität 332

Leukozyten, Stoffwechsel 509, 557
Lichtabsorption in Chlorella, gemessen mit dem Quantenaktinometer 132, 145
Lichtabsorption in Chlorella, gemessen mit der Ulbrichtschen Kugel 237
Licht, blaugrünes
  Hemmung der Katalyse durch Cyanwasserstoffsäure 255

Katalytische Wirkung bei der Photosynthese 242, 248
Nicht-Hemmung der Katalyse durch Phenanthrolin 256
Wirkung auf den assimilatorischen Quotienten $\frac{CO_2}{O_2}$ 253
Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts 261
Zusatz von blaugrünem Licht bei Messungen des Quantenbedarfs 414
Lichtinduzierte Atmung der Chlorella
Entdeckung 137
Methode der Messung 274, 289, 421
„Lichtphosphorylierung", siehe Phosphorylierung durch Dehydrierung
Lichtstärken, hohe und hohe Quantenausbeuten 202, 268
Lichtstrahl, Teilung mit 4 Prismen 140
Lichtstrahl, Teilung durch Spiegel 205

Manometrie, Fehlerquellen; Thermomanometrische Effekte; Kohlenoxyd und $KMnO_4$; Ferrocyanid und Ferricyanid sind in starkem Licht unbeständig 377
Manometrie, Sauerstoffbestimmung mit Dithionit 366
Manometrie bei höheren Temperaturen 368
Manometriegefäße, neue
Gefäße zur Bestimmung der freien und gebundenen CO_2 376, 469
Gefäße zur Bestimmung der Retention der Kohlensäure 372, 376
Gefäße zur Herstellung definierter Blausäure-Konzentrationen 553
Gefäße zur Konstanthaltung des CO_2-Drucks mit Carbonatgemischen 378, 379, 581
Gefäße zur Messung des Quantenbedarfs von Blättern 380
Gefäße zur Röntgenstrahlen-Dosimetrie 371
Gefäße, in denen die Wanne mit einer Birne verbunden ist 374
Gefäße zum Wechsel anaerober und aerober Bedingungen 564
Gefäßpaar für 2-Gefäßmethode 373
Universalgefäße I und II 555 und 556
Wannengefäße 369
Methoden, allgemeine 1
Methoden zur Messung der Photosynthese 129
Methoden, spezielle Übersicht 2

D-Milchsäure in Chlorella 423
Milchsäurebestimmung, optische 545
Mikroelemente bei der Zucht und bei Stoffwechselmessungen von Chlorella 207, 257, 264

Nikotinsäureamid, Demonstration der Wasserstoffübertragung durch Fluoreszenz 211

Pasteur-Reaktion in Lösungen 68
Phenanthrolin (ortho)
Hemmung der Dunkel-Phosphorylierung 612
Hemmung der fluorid-induzierten Dunkel-Atmung 611
Hemmung der Licht-Dehydrierungen 465, 622
Hemmung der Licht-Phosphorylierungen 465, 622
Hemmung der Photolytspaltung im Licht 291
Hemmung der Reduktion von Ferricyanid in Chlorella im Dunkeln 317
Hemmung der Resynthese der Glutaminsäure im Dunkeln 611
Hemmung der Resynthese des Photolyten im Dunkeln 613
Hemmung der Sauerstoffentwicklung im Licht bei der Photosynthese und den Grana-Reaktionen 560, 622
Vergleich von ortho und meta 560
Phosphorylierung durch Dehydrierung
Entdeckung 62
Gleichungen 62, 231, 234
Hemmung durch Arsensäure 62
Hemmung durch Phenanthrolin 465, 622
„Lichtphosphorylierung" 465, 622
Photolyse der Kohlensäure bei der Photosynthese 18, 435, 481, 567, 625
Photolyse des Wassers bei der Photosynthese 17, 435, 481
Photolyt der Photosynthese
Anhäufung in Chlorella im Dunkeln 567
Aerobe Synthese, anaerober Zerfall 574, 575
Aerobe Synthese in 2 Schritten 615
Einfluß des CO_2-Drucks 567
Hemmung durch Arsensäure 573
Hemmung des zweiten Schritts durch Blausäure 615
Kohlensäureentwicklung beim Zerfall im Dunkeln 625

Sauerstoffentwicklung im Licht 576
Stöchiometrische Beziehung zu Glutaminsäure, Chlorophyll und Sauerstoffkapazität 571, 572
Photosynthese, Zusammenfassung in Science 386
Polemik gegen die verminderte Atmung der Krebszellen 335

Quanten-Aktinometer, manometrisches 75
Quantenbedarf der Austreibung des Sauerstoffs im Licht 274
Quantenbedarf der Photosynthese
Bestimmung bei hohen Lichtintensitäten 201, 267, 414
Bestimmung mit dünnen Zellsuspensionen 414
Demonstration der hohen Quantenausbeuten im physiologischen Studentenkurs in Woods Hole (Mass.) 99
Einfluß des blaugrünen Lichts 242
Einfluß des CO_2-Drucks 165, 447, 452, 484, 582
Einfluß des Vanadiums 312
Einfluß des fluktuierenden Lichts bei der Züchtung der Chlorella 361
Die Kompensationsmethode 60
Lösung des Mehrquanten-Problems 135, 278, 289, 418, 421
Resultate 1961, nach 10 Jahren Weiterentwicklung der Methoden für
Chlorella 447, 452, 484, 582
Grüne Blätter 15 bis 20 542
Wiederentdeckung der hohen Quantenausbeuten in den USA nach dem Krieg 92
1-Quantenreaktion der Photosynthese
Entdeckung 135
Erste Methode der Messung 137
Spätere Methoden der Messung 278, 289, 418, 421
Überblick 16, 154

Retention der Kohlensäure
Messung mit siamesischer Birne 372
Messung mit den neuen Wannengefäßen 376
Theorie 239
Röntgenstrahlen
Ersatz der Bestrahlung durch bestrahlte Lösungen bei der Hemmung der Gärung 586
Gärungshemmung durch Bestrahlung von Krebszellen und embryonalen Zellen 518, 587
Methaemoglobinbildung durch Bestrahlung reiner Lösungen 534
Methaemoglobinbildung durch Bestrahlung von Erythrozyten von Rind und Ente 536
Stoffwechselhemmung durch Bestrahlung aerober und anaerober Milchsäurebakterien 588
Strahlenempfindlichkeit von Einzelzellen und Gewebzellen desselben Tumorstamms 536
Strahlenwirkung und Wasserstoffperoxyd 515, 534, 585, 588
Verbindung von Manometrie und Fricke-Dosimetrie 515
Vergleich von Wachstumshemmung und Gärungshemmung 620

Salze bei der Zucht und bei Stoffwechselmessungen von Chlorella 256, 257, 265
Salzlösungen S und S* für Versuche mit Chlorella 359, 402
Sauerstoffatmung, Notwendigkeit zur Bildung des Photolyten 568
Sauerstoffatmung, Teilreaktion der Photosynthese 427
Sauerstoffhalbwert-Drucke der Photosynthese 427
Sauerstoffkapazität der Chlorella 274, 289
Sauerstoffübertragendes Ferment, (Eisenoxygenase) Demonstration 208
Spektralbezirke, Isolierung für photochemische Versuche 141, 203, 248, 261, 414, 447
Spiegel, der bewegliche 201, 205
Spiegel, der teildurchlässige 201, 205, 262
Subkulturen embryonaler Zellen 563
Stoffwechsel von Körperzellen und Krebszellen unter physiologischen Bedingungen 496
Stoffwechsel von Körperzellen, von normalen Zellen und Krebszellen 488

Teratome, Erzeugung durch trypsinisierte embryonale Zellen 563
Thioharnstoff als Akzeptor bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll 75
Tumoren, Kristallisation eines Gärungsferments 69, 70

Vanadium bei der Zucht und bei Stoff-

wechselmessungen von Chlorella 264, 312
Wasserstoffperoxyd in belichteter Chlorella 467, 606
Wasserstoffperoxyd, Hemmung der Gärung 521
Wasserstoffperoxyd, Wirkung auf Krebszellen und embryonale Zellen 501
Wirkungsgruppen der oxydierenden und reduzierenden Fermente
Vortrag mit Demonstration 208

Xenon-Hochdrucklampe, zur Messung des Quantenbedarfs 203

Zwei-Gefäß-Methode zur Messung des Gaswechsels 111
Zymohexase, Abnahme im Blut krebskranker Tiere bei Narkotisierung mit Urethan 224
Zymohexase im Blut krebskranker Tiere und Menschen 224
Zymohexase, Kristallisation aus Muskeln und aus Hefe 66, 220
Zymohexase, Übergang aus den Tumoren in die Umgebung unter anaeroben Bedingungen 225
Zymohexase, keine Vermehrung im Blut gravider Tiere 224

Subject Index

Active groups of oxidizing and reducing enzymes, demonstration by experiments, 208
Alcohol in nature, demonstration of formation by fluorescence, 211
  equation of formation, 47
Amino acids in Chlorella, experiments with $^{14}CO_2$, 384
Anaerobiosis, facultative of cancer cells, application to chemotherapeutics, 629
    as basis of classification of cancer cells, 631
    experiments with nonpathogenic anaerobic spores, 628
    experiments with tetanus spores, 628
    the way to the discovery, 627
  partial, of cancer cells, 524
Ascites cancer cells, metabolism and release of zymohexase, 197
Ascorbic acid, manometric determination, 541

Blue-green light, action on the assimilatory quotient CO_2/O_2, 253
  action spectrum of, 261
  addition of, in measurements of quantum requirement of photosynthesis, 414
  catalytic action in photosynthesis, 242, 248
  inhibition of catalysis by hydrocyanic acid, 255
  no inhibition by phenanthroline, 256
Bone marrow, trypsinization and determination of metabolism, 557

Cancer, prevention 247
Cancer cells, deficient respiration of, 335, 340, 344
  at high oxygen pressures, 216
  lecture, 322
  measurement of respiration by a new one-vessel method, 618
  relation of fermentation to malignancy, 332
Cancer metabolism, development in embryonic cells during *in vitro* culture, 539, 548
  development in kidney cells during tissue cultures, 505, 511
Cancer research, lecture, 244
Carbon atom 10 of chlorophyll, 304, 311
Carbon dioxide, and chlorophyll, 301
Carbon fixation in Chlorella, manometric measurement, 469
Carbonic acid, equilibrium pressures over bicarbonate-carbonate mixtures, 578
  influence of pressure, on quantum requirement of photosynthesis, 582
    on synthesis of photolyte, 567
  retention, 239, 372, 376
Carbon monoxide, inhibition of photosynthesis in embryonic leaves, 443
  inhibition of respiration in embryonic leaves, 443
Carotinoid oxygenase in Chlorella, 431
Catalase, addition to cancer cells during irradiation with X-rays, 521
  decrease in kidney cells during development of cancer metabolism *in vitro*, 511
Chemotherapeutics of tumors, 247
Chlorella, action of blue-green light, 242
  amino acids, 384
  carotinoid oxygenase, 431
  CO_2 development by fluoride, 347, 400, 567, 615
  cultivation, of cells of different properties, 401
    in fluctuating light, 295, 361, 414
  glutamic acid, splitting and resynthesis, 400, 609
  glycollic acid, 458
  half-value CO_2 pressure of photosynthesis, 481
  half-value oxygen pressure of respiration and photosynthesis, 427
  hydrogen peroxide formation in light, 467, 606
  D-lactic acid, 423
  light-induced respiration, 274, 289, 421
  microelements, 207, 257, 264
  oxygen capacity, 274, 289
  oxygen transfer in light, 595
  photolyte, 567, 625
  quantum requirement of 2.75 per molecule of oxygen developed, 447, 452, 484, 582
  1-quantum reaction of photosynthesis, 16, 135, 278, 289, 418, 421
  salt solutions K, S, and S*, 256, 257, 265, 359, 402
  vanadium, 264, 312

Chlorophyll, oxygen transfer in light, in aqueous solutions of thiourea, hydroquinons, and ascorbic acid, 595
Compensation of respiration in measurements of quantum requirement of photosynthesis, 108, 109
Cytodeuteroporphyrin, 178
tribromo derivative, 187
Cytohemin, from heart muscle, 175

Deficient respiration of cancer cells, polemics against, and replies, 335, 340, 344
Deuteroporphyrins, syntheses, 189

Embryonic metabolism, transformation to cancer metabolism, by a chemical factor, 562
during *in vitro* culture, 539, 548
Ethylenediaminetetraacetic acid, addition of, to crystallize enzymes, 223
as stabilizer of H_2O_2, 585

Fermentation enzymes, in the blood of tumor-bearing animals, 71
crystallization and optical tests, 47
Ferricyanide, development of oxygen in illuminated Chlorella, 316
reduction by living Chlorella in the dark and in light, 313
Flavin nucleotide, demonstration of hydrogen transfer by fluorescence, 211
Fluorescence, demonstration of biological hydrogen transfer, 211, 212
Fluoride, development of CO_2 from Chlorella, 347, 400, 567, 615
Fluoride-induced respiration in Chlorella, connected to resynthesis of glutamic acid, 406, 611, 613

Gas exchange of cells, measurement by two-vessel method, and equations, 111
Glutamic acid in Chlorella, discovery in photosynthesis, 383
function in photosynthesis, 411, 567
inhibition of splitting by hydrocyanic acid, 405
splitting and resynthesis, 400, 609
stoichiometric relation, to aerobic CO_2, 409
to chlorophyll, 571
to oxygen capacity, 572
to the photolyte, 572
Glycollic acid in Chlorella, 458

Harden-Youngs equation, 63
Hill reactions, light-induced respiration, the key to the Hill reactions, 19
the necessary CO_2 pressures, 481
necessity of CO_2, 435
Hydrocyanic acid, defined pressures in manometry, 553
inhibitor, of catalase in Chlorella, 465
of the catalysis of blue-green light, 255
of the decomposition of glutamic acid in Chlorella, 350, 405
of the Hill reactions at low oxygen pressures, 464, 465
of "light phosphorylation" at low oxygen pressures, 465
of photosynthesis, 617
of the second step of the synthesis of the photolyte in Chlorella, 615
no inhibitor, of the Hill reactions at higher oxygen pressures, 464, 465
of "light phosphorylation" at higher oxygen pressures, 465
Hydrogen peroxide, action on embryonic and cancer cells, 501
in illuminated Chlorella, 467, 606
inhibition of fermentation, 521
Hydroxy-tyramine, a biological oxidation catalyst of photosynthesis, 583

Iron oxygenase (oxygen-transferring enzyme), demonstration, 208

Lactic acid determination, optical, 545
D-Lactic acid in Chlorella, 423
Leaves, green, quantum requirement per molecule of oxygen developed, 542
Leucocytes, metabolism, 509, 557
Light absorption in Chlorella, measurement, with the quanta-actinometer, 132, 145
with the Ulbricht sphere, 257
Light beam, partition, by four prisms, 140
by mirror, 205
Light-induced respiration of Chlorella, discovery, 137
measurement, 274, 289, 421
Light intensities, high, and high quantum yields, 202, 268
"Light phosphorylation", see phosphorylation by dehydration

Manometric vessels, to change from aerobic to anaerobic conditions, 564

to determine free and bound CO_2, 376, 496
to determine retention of CO_2, 372, 376
to keep the CO_2 pressure constant by means of bicarbonate-carbonate mixtures, 378, 379, 581
to measure the quantum requirement of leaves, 380
to produce defined hydrocyanic acid pressures, 553
with sidearm connected to trough, 374
trough, 369
for two-vessel method, 373
universal I and II, 555, 556
for X-ray dosimetry, 371
Manometry, at high temperatures, 368
oxygen determination by dithionite, 366
sources of error, 377
Metabolism, of body cells under physiological conditions, 496
of normal and cancer cells, 488
Methods, general, 1
to measure photosynthesis, 129
specified, 2
Microelements, in experiments with Chlorella, 207, 257, 264
Mirror, the mobile, 201, 205
the partly transmitting, 201, 205, 262
Multiquanta-problem, solution, 135, 278, 289, 418, 421

Nicotinamide, demonstration of hydrogen transfer by fluorescence, 211, 212

Oxygen, necessary pressure in photosynthesis, 427
Oxygen capacity of Chlorella, aerobic synthesis, anaerobic decomposition, 274, 282, 567
discovery, 274
inhibition by phenanthroline, 291
quantum requirement of oxygen development in light, 281
Oxygen respiration, the energy-supplying reaction for the synthesis of the photolyte, 568
partial reaction in photosynthesis, 427

Pasteur reaction in solutions, 68
o-Phenanthroline, comparison of ortho and meta, 560
inhibitor, of dark phosphorylation, 612
of fluoride-induced dark respiration, 611
of light dehydrations, 465, 622
of light phosphorylations, 465, 622
of oxygen development in light (in photosynthesis or in grana reactions), 560, 622
of the photolyte-splitting in light, 291
of reduction of ferricyanide in Chlorella in the dark, 317
of resynthesis of glutamic acid in the dark $n/100$, 611
of resynthesis of the photolyte in the dark, 613
Phosphorylation by dehydration, discovery, 62
equations, 62, 231, 234
inhibition, by arsenate, 62
by phenanthroline, 465, 622
"light phosphorylation", 465, 622
Photolysis, of CO_2 in photosynthesis, 18, 294, 435, 481, 625
of water in photosynthesis, 17
Photolyte of photosynthesis, accumulation in Chlorella in the dark, 567
aerobic synthesis, anaerobic decomposition, 574, 575
in two steps, 615
CO_2 development in the dark by fluoride, 625
influence of CO_2 pressure, 567
inhibition, by arsenate, 573
of the second step by hydrocyanic acid, 615
oxygen development in light, 576
stoichiometric relation to glutamic acid, chlorophyll, and oxygen capacity, 571, 572
Photosynthesis, methods, 129
survey in science, 386

Quanta-actinometer, manometric, 75
Quantum requirement of photosynthesis, 14, 15, 449
the compensation method, 60
determination, at high light intensities, 201, 267, 414
with thin cell suspensions, 414
high quantum yield, 92, 99
influence on, of blue-green light, 242
of CO_2 pressure, 165, 447, 452, 484, 582
of fluctuating light intensity during cultivation of Chlorella, 361
of vanadium, 312
results in 1961, 447, 452, 484, 542, 582

1-Quantum reaction of photosynthesis, discovery, 135
measurement, first method, 137
later methods, 278, 289, 418, 421
survey, 16, 154
Quinone reactions in light, action of hydrocyanic acid, 19, 464
action of phenanthroline, 622
discovery of light-induced respiration, 465
H_2O_2 formation in catalytic quinon reactions, 465
light-induced respiration, 19
"light phosphorylation", 622
phosphorylation by catalytic quinone reactions, 466
stoichiometric and catalytic, 462

Respiration, compensation by light in Chlorella, 100
neglected in measurements of the quantum requirement of photosynthesis at high light intensities, 202
Retention of CO_2, measurement, with trough vessels, 376
with vessels with siamese sidearm, 372

Salts, in experiments with Chlorella, 256, 257, 265
Salt solutions S and S*, in experiments with Chlorella, 359, 402
Spectral regions, isolation, 141, 203, 248, 261, 414, 447
Subcultures, of embryonic cells, 563

Teratomata, production by injection of trypsinized embryonic cells, 563
Thiourea, as acceptor in oxygen transfer by chlorophyll, 75
Tumors, crystallization of a fermentation enzyme, 69, 70
Two-vessel method to measure the gas exchange of cells, equations, 111

Vanadium, in experiments with Chlorella, 264, 312

Xenon high-pressure lamp, to measure the quantum requirement of photosynthesis, 203
X-rays, action of rays and formation of H_2O_2, 515, 534, 585, 588
combination of manometry and Fricke dosimetry, 515
comparison of inhibition of growth and inhibition of fermentation, 620
comparison of ray action on single cells and tissue cells of the same tumor, 536
equivalence of irradiation and irradiated solutions, 586
formation of methemoglobin, in pure solutions, 54, 534
in red blood cells of cattle and ducks, 536
inhibition of fermentation in cancer cells and embryonic cells, 518, 587
of metabolism in aerobic and anaerobic lactic acid bacteria, 588

Yeast zymohexase, crystallization as mercury salt, 220

Zymohexase, crystallization from muscles and yeast, 66, 220
increase in the blood of tumor-bearing animals and men, 224
normal, in the blood of pregnant animals, 224
release to blood under anaerobic conditions, 225

Mabi

138.–

25.4.62

1c